



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

Estudio Comparativo de los Sistemas de Captación
del ácido L-Glutámico y la Taurina en el Epitelio
Pigmentario de la Retina

TRABAJO DE TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO PRESENTA:

MARIA DEL REFUGIO SALDAÑA GARCIA

MEXICO, D. F.

1991.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

"ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS SISTEMAS DE CAPTACION DEL ACIDO L-
GLUTAMICO Y LA TAURINA EN EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA"

TRABAJO DE TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA:

MARIA DEL REFUGIO SALDAÑA GARCIA

MEXICO, D. F.

1991.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la doctora Rocío Salceda Sacanelles, con apoyo del sistema de becas de UNAM-DGAPA.

Este pequeño logro lo dedico a tu memoria padre, y se que desde donde estés esto será un pequeño orgullo para tí, con todo mi amor, tu hija.

Para mi madre, por todo el amor y la abnegación incondicional que nos ha brindado, y mis hermanos: Sara, Juan Manuel, Queli, Mari y Cony, quienes han sido guías en mi camino, con muchísimo cariño.

A Gustavo, mi compañero siempre.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la doctora Rocio Salceda Sacanelles, por su colaboración en la realización de la presente tesis, así como a mis amigos y compañeros de laboratorio.

INDICE

	Página
I. LISTA DE ABREVIATURAS	6
II. INTRODUCCION	
El epitelio pigmentario de la retina	
Estructura	7
Embriología	11
Funciones	12
Acido glutámico	20
Taurina	23
II. OBJETIVOS	28
III. MATERIALES Y METODOS	29
IV. RESULTADOS	
(a) Acido glutámico	31
(b) Acido D-aspártico	33
(c) Taurina	35
Gráficas	38
V. DISCUSION	47
VI. BIBLIOGRAFIA	53

LISTA DE ABREVIATURAS

C	control
iac	iodoacetato
DNP	2, 4-dinitrofenol
KCN	cianuro de potasio
ouab	ouabaína
asp	ácido aspártico
tau	taurina
ka	ácido kaínico
GABA	ácido γ -aminobutírico
α -aa	ácido α -aminoadípico
OHglu	hidroxamato de L-glutamato
OHasp	hidroxamato de L-aspartato
β -ala	β -alanina
glic	glicina

INTRODUCCION

La retina de los vertebrados, órgano fotosensible que yace en el fondo del globo ocular, está formada por varios tipos celulares, células fotorreceptoras, bipolares, amacrinas y ganglionares, las cuales están organizadas en forma laminar. La capa más interna, en contacto con el humor vítreo está formada por las células ganglionares. Los somas de las células bipolares, horizontales y amacrinas constituyen la denominada capa nuclear interna, mientras que la capa nuclear externa está formada por los somas de las células fotorreceptoras. Estas células hacen contactos sinápticos en las capas plexiforme externa e interna. Las células de Müller, son las células gliales y se extienden desde la membrana limitante interna (terminales de las células ganglionares) a la membrana limitante externa (somas de las células fotorreceptoras) (figura 1). Los fotorreceptores están en contacto directo con el epitelio pigmentario de la retina (EPR), el cual separa a la retina, de los capilares sanguíneos de la coroides (figura 1).

El EPR se encuentra constituido por una monocapa continua de células neuroepiteliales de forma exagonal, el cual se inicia en el borde de la cabeza del nervio óptico y se extiende periféricamente hasta la ora serrata, donde el EPR se continúa como el epitelio pigmentario del cuerpo ciliar (figura 1).

Las células del EPR muestran diferenciación de su membrana plasmática o asimetría celular, la cual se mantiene debido a que las células se encuentran unidas por uniones estrechas. Estas uniones intercelulares y los desmosomas se encuentran formando un

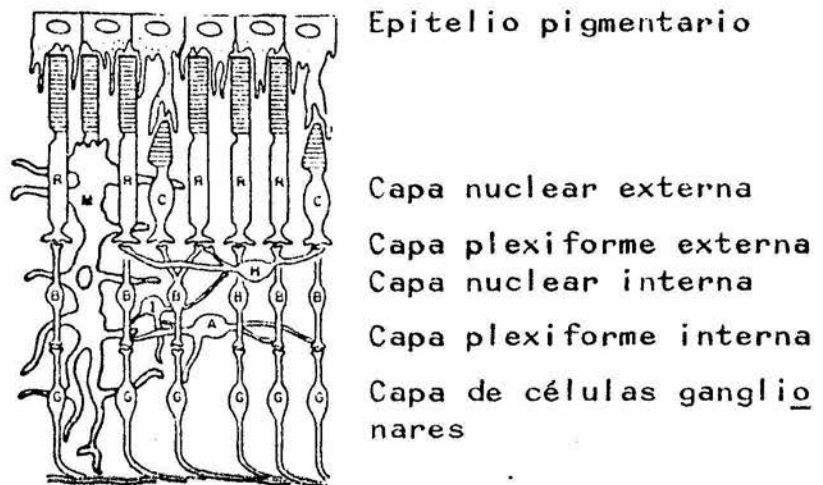
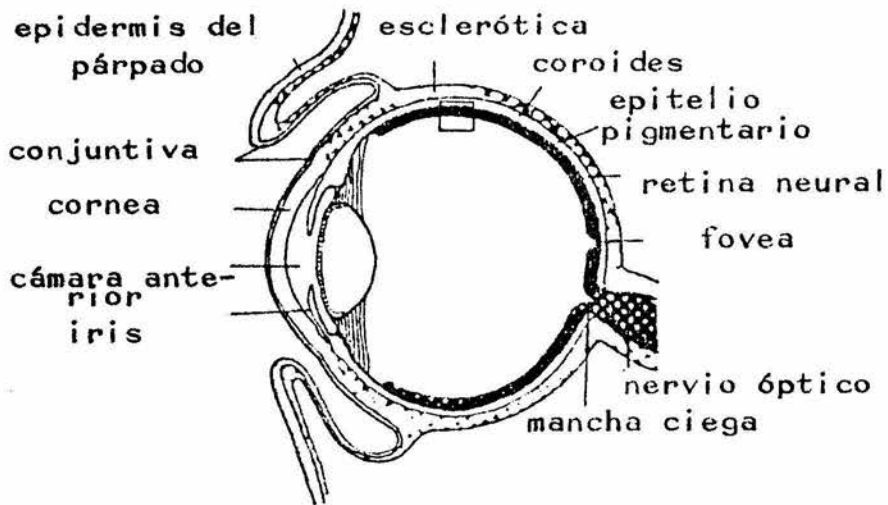


Figura 1. (a) diagrama de una sección horizontal del ojo de los vertebrados. (b) capas retinianas y sus relaciones sinápticas. Los principales tipos celulares son: R, bastones; C, conos; H, células horizontales; B, células bipolares; A, amacrinas; G, ganglionares; I, interplexiformes; M, células de Müller.

cinturón continuo en la superficie lateral de la célula llamado barra terminal (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Clark, 1986). En su superficie apical, la cual mira hacia la retina, la célula contiene microvellosidades largas, que están situadas principalmente entre los segmentos externos de los fotorreceptores, y microvellosidades cortas, las cuales forman cubiertas alrededor de las puntas de los mismos (figura 2). Las microvellosidades del EPR y los segmentos externos de los fotorreceptores se encuentran embebidos en una matriz extracelular, y separados por un espacio subretiniano o interfotorreceptor (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979).

La membrana basal de la célula del EPR contiene pequeñas invaginaciones y se encuentra separada de la superficie basal de los capilares de la coroides por una estructura compuesta llamada membrana de Bruch, la cual está constituida por una lámina basal, secretada por la membrana basal del EPR, una zona de colágena interna, una capa elástica intermedia, una zona de colágena externa y la lámina basal de los capilares de la coroides (figura 2) (Clark, 1986; Zinn y Benjamin-Henkind, 1979).

Las células del EPR son ricas en organelos. Su citoplasma contiene un núcleo, localizado en la porción basal de la célula; presenta numerosas mitocondrias y lisosomas, gránulos de melanina, fagosomas, aparato de Golgi y un profuso retículo endoplásmico liso (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979) (figura 2).

La estructura básica del EPR es uniforme en la mayoría de los vertebrados, aunque existen pequeñas pero definidas variaciones en la estructura fina en las diferentes especies, las cuales

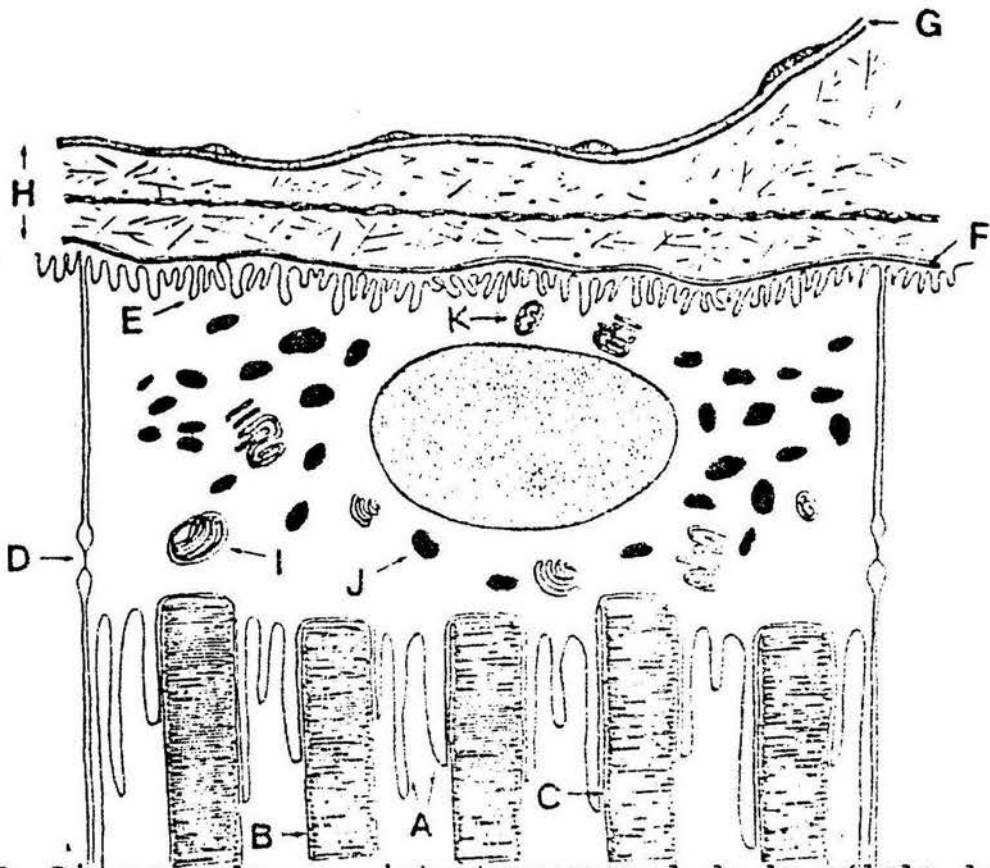


Figura 2. Diagrama de una vista transversal de la célula del EPR. A, microvellosidades de la membrana plasmática apical; B, segmento externo del fotorreceptor; C, espacio subretiniano; D, uniones estrechas; E, invaginaciones de la membrana plasmática basal; F, lámina basal de la célula del EPR; G, lámina basal de un capilar coroidal; H, membrana de Bruch; I, fagosoma; J, gránulo de melanina; K, mitocondria.

parecen tener relación con variaciones en la estructura de la retina (Kuwabara, 1969; Kuwabara, 1979), y algunas principalmente relacionadas con la vascularidad de las mismas (Kuwabara, 1969). Así por ejemplo, las retinas de primates tienen vasos bien desarrollados, los cuales se originan de arterias centrales del nervio óptico. Similarmente otros mamíferos (gato, perro, ratón y rata) tienen el mismo tipo de retina, pero sus vasos se originan a partir de varias de las arterias ciliares (Kuwabara, 1969). En estas especies, las células del EPR tienen invaginaciones basales moderadas, y a excepción de los roedores, su citoplasma carece de gotas de lípidos. Sin embargo, los cuyos y los conejos carecen de vasos en el tejido retiniano, y las aves y los reptiles tienen una estructura especializada denominada pecten en lugar de vasos retinianos (Kuwabara, 1969; Kuwabara, 1979). Las células del EPR de estas especies generalmente tienen invaginaciones basales bien desarrolladas y abundantes gotas de lípidos, y en el caso de los vertebrados no mamíferos tienen microvellosidades largas y grandes, generalmente mayores en volumen que el citoplasma en la porción principal del cuerpo (Kuwabara, 1979).

EMBRIOLOGIA DEL EPR

Durante el desarrollo ontogenético, el EPR y la retina, se derivan simultáneamente del neuroectodermo al igual que el cerebro. El epitelio pigmentario se diferencia a partir de la vesícula óptica, la cual es una evaginación de la pared del diencéfalo (figura 3a). Posteriormente la vesícula óptica sufre proliferación celular, se invagina y forma la copa óptica, que consiste de dos capas, la externa y la interna. La capa externa

permanece como una capa simple de células columnares y cuboidales, las cuales dan lugar al EPR, cuerpo ciliar e iris; mientras que la pared interna se diferencia en la retina, epitelio ciliar no pigmentado y epitelio posterior del iris (figura 3 b y c) (Mund y Rodrigues, 1979; Farber y Adler, 1986).

FUNCIONES DEL EPR

La retina neural y el EPR se encuentran estrechamente asociados formando una unidad funcional. Debido a su morfología y localización, el EPR funciona como una barrera que regula el paso de sustancias de y hacia la retina a través del transporte de fluidos y metabolitos en dirección retina-coroides o viceversa. El EPR transporta y metaboliza el retinol, el cual es incorporado a la rodopsina, molécula fotosensible que se encuentra embebida en las células fotorreceptoras. La estructura y función de la célula fotorreceptora se mantiene a través de una síntesis continua de membranas en su parte basal y la degradación de éstos en el segmento distal a través de una actividad fagocítica llevada a cabo por el EPR (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979). La melanina, presente en la célula del EPR, atrapa el exceso de luz que llega a la retina favoreciendo la formación de una imagen definida. En los vertebrados, la melanina es sintetizada en células especializadas, que son los melanocitos integumentarios y las células del EPR. En el EPR, la melanina es formada a partir del aminoácido tirosina, a través de la acción catalítica de la enzima tirosinasa, reacción que requiere de cobre, zinc y oxígeno. La tirosinasa convierte a la tirosina en

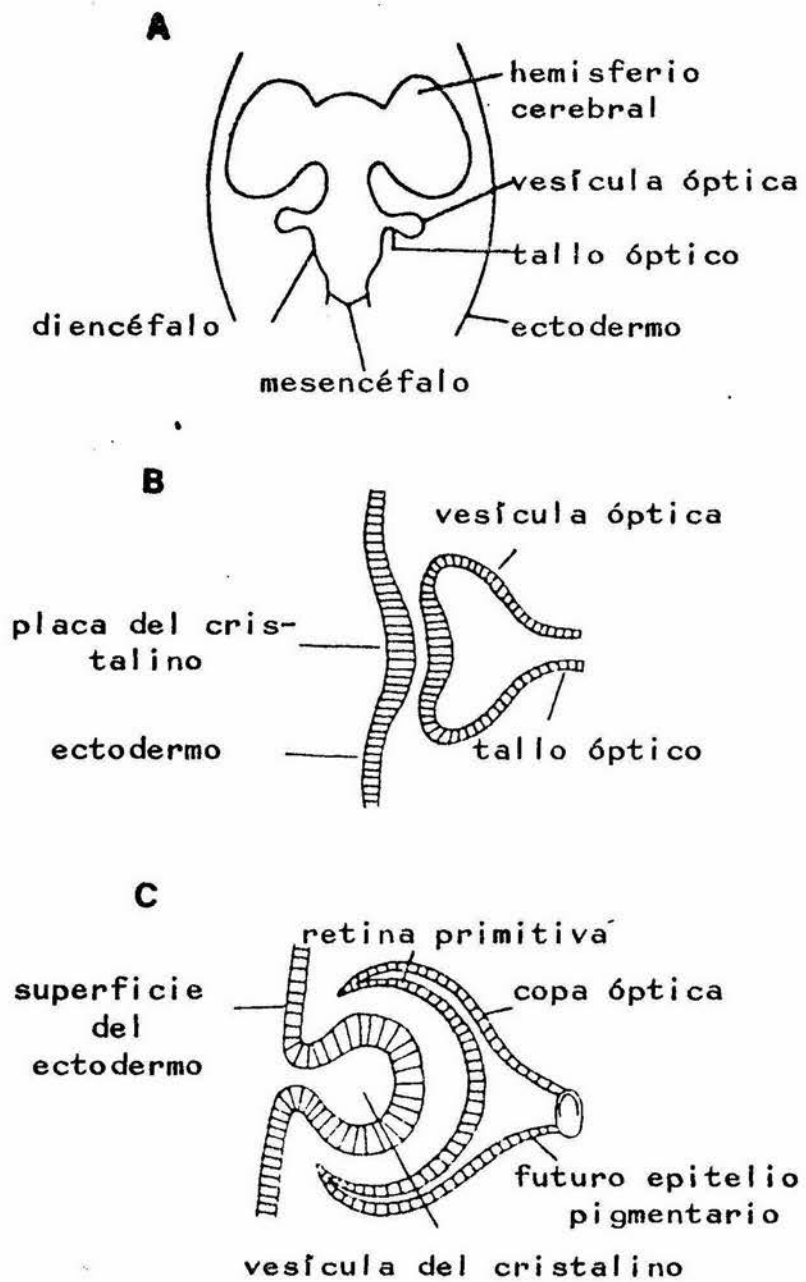


Figura 3. Representación esquemática del desarrollo de la retina y el EPR. A y B, formación de la vesícula óptica por evaginación de la pared del diencéfalo. C, Desarrollo de la copa óptica y su diferenciación en dos capas a partir de la invaginación de la vesícula óptica.

L-3, 4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y a su vez a esta a dopaquinona, que posteriormente sufre varias modificaciones para dar lugar a la melanina (figura 4) (Garcia, Szabó y Fitzpatrick, 1979). La síntesis de la melanina en el EPR, está restringida a un organelo específico llamado melanosoma o gránulo de pigmento. La melanina está íntimamente asociada con el componente proteico del melanosoma, la matriz interna, a la cual se piensa que la melanina está adherida por uniones disulfuros (Garcia, Szabó y Fitzpatrick, 1979).

Morfológicamente, se han descrito cuatro estados separados en el desarrollo del melanosoma (Fitzpatrick y Quevedo, 1971), conocidos como estado I o premelanosomas, estado II, III y IV. Los melanosomas del estado I, se derivan del retículo endoplásmico liso, contienen filamentos finos, constituidos por una matriz proteica compuesta de una red regular de fibrillas y no contienen actividad de tirosinasa. El melanosoma en el estado II, se caracteriza por la fusión del premelanosoma con vesículas derivadas del aparato de Golgi, las cuales contienen tirosinasa. Durante el estado III del melanosoma, se lleva a cabo la síntesis de melanina, en este estado existe un oscurecimiento parcial de los filamentos del melanosoma. En el estado IV, el melanosoma está completamente melanizado, caracterizado por un oscurecimiento total de los filamentos de este organelo, sin embargo la actividad de la tirosinasa no es detectable (Garcia, Szabó y Fitzpatrick, 1979).

Una función importante del EPR está relacionada con el retinol o vitamina A y sus derivados. El retinol proviene de la dieta, es metabolizado por el hígado, y a partir de este órgano

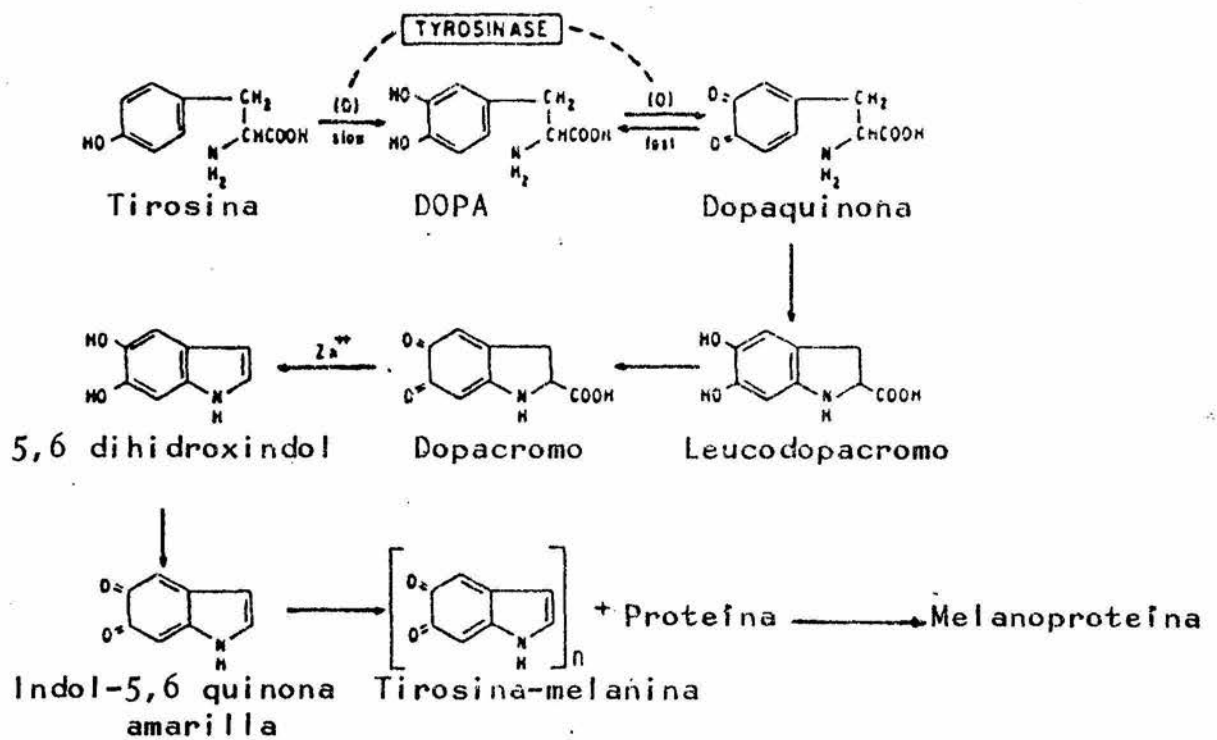


figura 4. Ruta de síntesis de la melanina en el EPR

llega al EPR a través de la sangre. El retinol es transportado en este tejido, asociado a una proteína del suero que se une al retinol (RBP), la cual a su vez se une a una proteína más grande llamada transtirretina, previamente llamada prealbúmina (Clark, 1986; Berman, 1979; Young y Bok, 1979). El complejo retinol-RBP deja la corriente sanguínea de los capilares de la coroides vía las fenestraciones diafragmadas de las células endoteliales, atravesando por difusión la membrana de Bruch. Una vez que el retinol llega a las células del EPR, se une a receptores específicos localizados en las membranas basal y lateral (Young y Bok, 1979; Clark, 1986), penetrando a la célula, y la RBP retorna a la corriente sanguínea, eliminándose por filtración en el riñón. En el EPR, el retinol se convierte a 11-cis-retinaldehído, y es transportado a las células fotorreceptoras, donde se incorpora a la rodopsina, molécula fotosensible localizada en las membranas del segmento externo del fotorreceptor (Clark, 1986; Young y Bok, 1979).

Dentro de la célula del EPR, el retinol puede unirse a una RBP citoplasmática (CRBP) o almacenarse en forma de éster (Clark, 1986; Young y Bok, 1979). Las proteínas que se unen al retinol en el EPR, transportan el retinol de la parte basal de la célula a la parte apical y viceversa; pero el mecanismo por el cual el retinol es transportado de la célula epitelial al espacio subretiniano es desconocido; aunque existe evidencia de una proteína en el espacio interfotorreceptor que une retinol (IRB) (Clark, 1986). La célula del EPR almacena el retinol en forma de éster, cuando no es necesitado para su función visual en la

retina. El retinol es esterificado con ácidos grasos, principalmente con los ácidos palmítico, esteárico y oleico (Young y Bok, 1979). Esta forma no es tóxica para la célula a diferencia del retinol, el cual tiene una acción lítica sobre las membranas (Clark, 1986).

Asimismo, el EPR participa en el proceso de renovación del segmento externo del fotorreceptor. Este fenómeno involucra la producción y ensamblaje de nuevos discos del segmento externo en la base del mismo acoplado con el desprendimiento de otros discos en la parte distal de las células, los que son fagocitados y degradados por el EPR (Besharse, et al., 1977; Bok y Young, 1979). El proceso de fagocitosis en el EPR consta de tres fases: reconocimiento y adhesión, ingestión y digestión (Bok y Young, 1979). En la fase de reconocimiento y adhesión, existe interacción entre los discos del segmento externo del fotorreceptor con la superficie externa de la membrana plasmática del EPR. Esta interacción parece estar mediada por receptores, lo cual permite la adhesión de los discos del segmento externo a la membrana plasmática del EPR (Shaw y Griffin, 1981; Bok y Young, 1979). La naturaleza química de los ligandos que interactúan con los receptores del EPR no han sido determinados, pero se sugiere que pueden corresponder a residuos de fucosa o galactosa, que se sugiere que pueden ser insertados a la molécula de rodopsina previo al desprendimiento de los discos (O'Brien, 1976).

La fase de ingestión prosigue una vez que ocurre la adhesión, y se caracteriza porque las microvellosidades del EPR engloban un paquete de discos, formandose subsecuentemente una vacuola fagocítica o fagosoma que migra al interior de la célula donde se

fusiona con un lisosoma (Bok y Young, 1979). Este proceso es probablemente mediado por microfilamentos (Feeney, 1973). En el proceso de digestión, tan pronto se forma la vacuola digestiva o fagosoma, el pH de éste se modifica de neutro a ácido, aumentando la actividad de las hidrolasas ácidas. Conforme avanza la digestión, se van dando cambios característicos en el contenido del fagosoma, tales como la deformación y compactación de discos que posteriormente tienen la apariencia de membranas concéntricas (Bok y Young, 1979). Una vez que se ha llevado a cabo la digestión, se forman los cuerpos residuales (Bok y Young, 1979) libres de actividad enzimática. Estos gránulos contienen los desechos de las membranas no digeridas y almacenan lipofucsina.

El EPR constituye junto con las células endoteliales de los capilares retinianos la barrera hematorretiniana (BRB). En este sistema de barrera predomina el movimiento de solutos del interior del ojo hacia la sangre, y tiene la característica de ser particularmente restrictiva (Cunha-Vaz, 1980).

La acción de barrera del EPR está determinada por la presencia de uniones estrechas en sus células (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979), las cuales se caracterizan porque sellan los espacios intercelulares e impiden el intercambio libre de solutos, lo que establece marcados gradientes de concentración de éstos a través de la membrana. Estos solutos usualmente se transportan por mecanismos especializados presentes en la membrana celular (Cunha-Vaz, 1980).

La función principal del EPR junto con los otros elementos de

la barrera hematorretiniana, es la de mantener el microambiente normal retiniano a través del transporte de agua (Miller, 1982) y de iones tales como sodio, cloro, bicarbonato, potasio, calcio y magnesio, transportándolos en dirección coroides-retina o retina-coroides (Bito y De Rousseau, 1980; Wiederholt y Zadunaisky, 1984).

En el EPR se ha reportado el transporte de metabolitos, tales como la glucosa, que es captada por un sistema de difusión facilitada (Pascuzzo et al., 1980; Masterson y Chader, 1981; Crosson y Pautler, 1982); el mio-inositol, cuya captación en las células del EPR en cultivo involucra al menos dos sistemas de transporte, uno mediado por un acarreador de alta afinidad y un proceso de difusión de baja afinidad (Khatami, 1987); el ácido ascórbico a través de un cotransporte con sodio (Khatami, 1988).

Particularmente importante es el transporte de aminoácidos en el EPR ya que el medio extracelular de la retina al igual que el del cerebro mantiene muy bajos niveles de aminoácidos libres, posiblemente debido a que muchos son neurotransmisores o "falsos transmisores", y una concentración más alta de estos en el medio extracelular puede interferir con la función neuronal normal (Bito y De Rousseau, 1980). Existen evidencias de que el EPR transporta diversos aminoácidos, tales como leucina (Chan, Chan y Yew, 1984) glutamato, aspartato (Pautler y Tengerdy, 1986), metionina, taurina (Miller y Steinberg, 1976; Edwards, 1977), arginina, histidina, serina, alanina, glicina, tirosina, fenilalanina, prolina, ornitina y cistina (Reddy, Chakrapani y Lim, 1977).

ACIDO GLUTAMICO

El ácido glutámico, es un aminoácido ácido, el cual posee una carga neta negativa a pH entre 6 y 7. Este aminoácido, además de formar parte de las proteínas y otras biomoléculas, es frecuentemente utilizado como fuente de energía, a través de su oxidación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (figura 5). En el sistema nervioso central (SNC), adicional a su actividad metabólica, el glutamato se considera un neurotransmisor excitador en diferentes regiones, tales como neocorteza, hipocampo, cerebelo, médula espinal y tallo espinal (Shank y Campbell, 1983). En la retina, como en otras regiones del SNC, el ácido glutámico y el ácido aspártico, parecen funcionar como neurotransmisores en las células fotorreceptoras (Ishida y Fain, 1981; Brandon y Lam, 1983; Lasater, Dowliling y Ripps, 1982), algunas células bipolares y ganglionares (Miller y Slaughter, 1985).

Diversas evidencias indican que durante la oscuridad, los fotorreceptores liberan continuamente glutamato, el cual provoca depolarización de las células horizontales y bipolares ON e hiperpolariza a las células bipolares OFF (Iuvone, 1986; Miller y Slaughter, 1985). En presencia de un estímulo luminoso, la liberación del glutamato por el fotorreceptor es reducida (Miller y Slaughter, 1985); provocando que las células horizontales y bipolares ON se hiperpolaricen, mientras que las células bipolares OFF se depolarizan. La acción del glutamato como neurotransmisor es concluida por su recaptura a través de mecanismos de captación de alta afinidad (White y Neal, 1976; Thomas y Redburn, 1978).

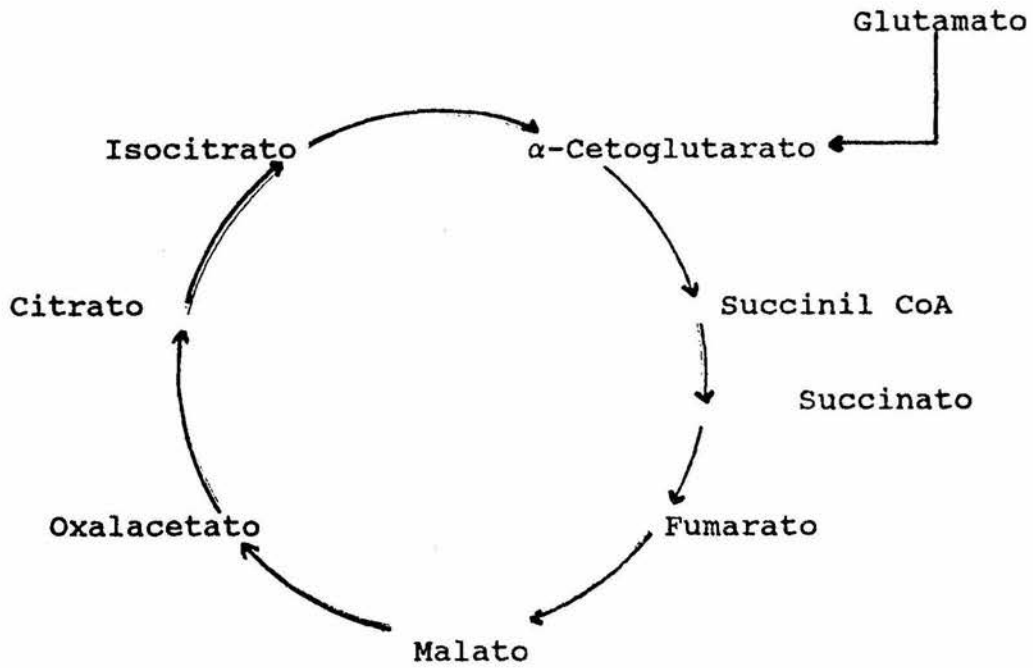


Figura 5. Ruta de entrada del esqueleto de carbono del ácido glutámico en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En el cerebro, el glutamato es transportado activamente, en contra de un gradiente de concentración, a través de la barrera hematoencefálica del intersticio cerebral hacia la corriente sanguínea (Pardridge, 1979). Este sistema de transporte activo controla los niveles cerebrales de glutamato, y persiste aun cuando las concentraciones plasmáticas se eleven hasta 260 veces de los niveles fisiológicos (Pardridge, 1979).

Es interesante que los órganos circunventriculares (eminencia media, órgano subfornical, etc.), los cuales carecen de la barrera hematoencefálica acumulan una gran cantidad de glutamato en respuesta a un incremento de éste en el plasma. La administración de dosis elevadas de glutamato (0.5 a 4 g/kg), produce necrosis neuronal en los órganos circunventriculares y en áreas contiguas a estos (Olney, 1982; Pardridge, 1979). Dosis mayores de glutamato inducen rompimiento de la barrera hematoencefálica, causando hinchamiento de las neuronas y depresión gradual de la actividad neuronal (Pardridge, 1979). Particularmente susceptibles a los efectos tóxicos del ácido glutámico son las neuronas de animales inmaduros, en los que la barrera hematoencefálica no está desarrollada completamente (Shank y Campbell, 1983).

La retina es otra región del SNC que es afectada por dosis tóxicas de glutamato. Este efecto puede ser debido a un decremento en la actividad de el sistema de eflujo activo de la barrera hematorretiniana para aminoácidos ácidos, o a un incremento en la actividad del sistema de captación para el glutamato a través del cuerpo ciliar (Pardridge, 1979). La

primera evidencia de los efectos tóxicos del glutamato en la retina, la aportaron los estudios de Lucas y Newhouse (1957), quienes encontraron que la retina interna de roedores neonatales es afectada por la administración intraperitoneal de glutamato. La acción neurotóxica del ácido glutámico en la retina se limita a la capa plexiforme interna. Esto se demostró por estudios realizados por Potts et al. (1960), ya que la lesión del glutámico en la retina provoca pérdida de la onda b del electroretinograma y la persistencia de la onda a, por lo que se dedujo que las neuronas de las zonas internas de la retina tienen mayor sensibilidad a los efectos tóxicos del aminoácido, mientras que los fotorreceptores son prácticamente no dañados. Las lesiones producidas por el glutamato y sus análogos son probablemente debidas a una estimulación excesiva de los receptores a aminoácidos ácidos (Miller y Slaughter, 1985), lo que posiblemente provoca un hinchamiento excesivo y lisis de las células (Olney, 1982). Esta respuesta se explica de la siguiente manera: el efecto de un aminoácido excitatorio es incrementar la permeabilidad al sodio, el cual entra a la célula y la depolariza. Si el movimiento interno del sodio es acompañado por la entrada de cloro, entonces el agua entra también a la célula provocando el hinchamiento (Miller y Slaughter, 1985).

TAURINA

La taurina (ácido 2-amino etanosulfónico) es un constituyente ubicuo en tejidos excitables. Se encuentra en altas concentraciones en el tejido nervioso, corazón, glándulas endócrinas, plaquetas y linfocitos (Oja y Kontro, 1983; Pasantes-

Morales, 1985). En la retina, la taurina se encuentra en grandes concentraciones, y se localiza fundamentalmente en las células fotorreceptoras (Orr et al., 1976; Kennedy y Voaden, 1976).

Las funciones de la taurina no están bien definidas, pero se ha determinado que se requieren niveles críticos de este aminoácido en la retina para mantener la estructura de los fotorreceptores (Hayes, et al, 1976; Berson, et al, 1976). Una de las funciones propuestas para este aminoácido, es la de neurotransmisor. La taurina ejerce un efecto depresor en la actividad neuronal en el SNC (Curtis y Watkins, 1960) incluyendo la retina (Pasantes-Morales, et al, 1973), en la que induce una rápida y específica depresión de la amplitud de la onda b del electrorretinograma (Pasantes-Morales, et al., 1972), por lo cual se ha propuesto que tiene un posible papel como inhibidor en la transmisión del impulso nervioso. Además se han demostrado en la retina sistemas de captación de alta afinidad para la taurina (Ehinger, 1973; Starr, 1978; Schmidt, 1980) y su liberación por depolarización (Starr y Voaden, 1972; Pasantes-Morales et al, 1974). Sin embargo, las propiedades mencionadas tienen discrepancias. Por ejemplo, las acciones postsinápticas de la taurina son antagonizadas por bicuculina y estrictina, los cuales son antagonistas del ácido γ -aminobutírico y la glicina, respectivamente; la liberación por depolarización no depende de Ca^{++} , propiedad característica de los neurotransmisores; y por último la presencia de taurina tanto en células excitatorias como inhibitorias, sugiere que no tiene funciones restringidas a la inhibición postsináptica (Pasantes-Morales, 1985).

Se ha encontrado que la taurina tiene un efecto protector de la estructura del fotorreceptor, ya que el daño provocado por la iluminación del segmento externo aislado del fotorreceptor y por la incubación en un medio libre de calcio, son prevenidos por la adición de taurina al medio de incubación (Pasantes-Morales, Ademe y Quesada, 1981)

Debido a la evidencia anterior, se ha propuesto que la taurina tiene una acción moduladora como estabilizador de membrana (Kramer et al., 1981) función que puede explicar algunos de sus efectos fisiológicos y farmacológicos. Los mecanismos por los cuales se llevaría a cabo la función de estabilizador de membrana, parecen involucrar la interacción de la taurina con flujos iónicos, particularmente aquellos de potasio y calcio, los cuales influyen en la integridad de la membrana. La capacidad protectora de la taurina en la estructura del segmento externo del fotorreceptor, se ha explicado que puede ser a través de modular las interacciones del calcio con la membrana y de esta manera evitar una sobrecarga o deficiencia extrema de calcio, y por lo tanto contribuir a mantener la integridad de la membrana (Pasantes-Morales, 1985).

La biosíntesis de la taurina está directamente vinculada al metabolismo de los aminoácidos sulfurados (figura 6) (Oja y Kontro, 1983) como metionina y cisteína. La conversión de cisteína a taurina procede por varias vías. La cisteína es oxidada a ácido cisteín sulfinico, el cual puede sufrir descarboxilación para formar hipotaurina con la subsecuente oxidación a taurina; o bien ser oxidado a cisteato seguido por descarboxilación directa a taurina (figura 6) (Oja y Kontro,

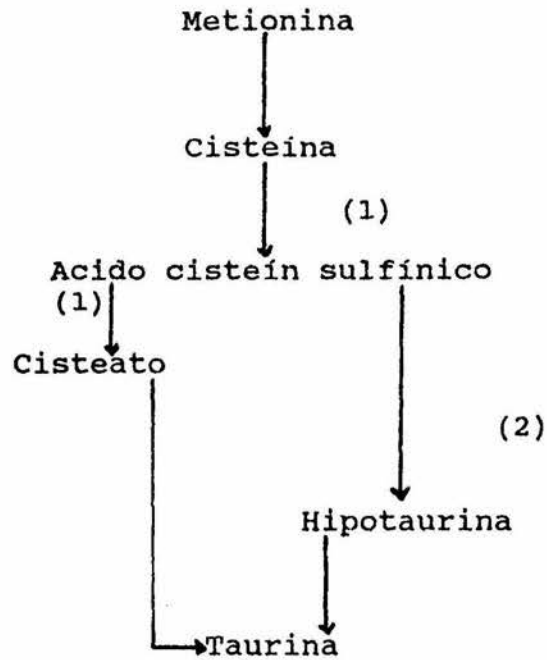


Figura 6. Ruta principal de biosíntesis de la taurina en el sistema nervioso central. Las enzimas que participan son: (1) cisteín dioxigenasa, (2) ácido cisteín sulfínico descarboxilasa.

1983; Pasantés-Morales, 1985). Así mismo, la taurina proviene de la dieta, y en algunas especies como en los gatos, que no la sintetizan, constituye la única fuente de obtención del aminoácido. La deficiencia de taurina en la dieta, provoca un decremento del 70 % en los niveles de este aminoácido en la retina (Berson, et al, 1976) y una alteración en la estructura del segmento externo del fotorreceptor (Hayes, et al, 1976).

El EPR tiene la capacidad de acumular taurina, lo cual se demostró por estudios autorradiográficos (Lake, Marshall y Voaden, 1977), fisiológicos (Miller y Steinberg, 1976) y bioquímicos (Edwards, 1977). Estudios que demostraron la presencia de mecanismos de alta y baja afinidad para transportar taurina en contra de un gradiente de concentración. Miller y Steinberg (1976), midieron el transporte de taurina a través del EPR de rana y encontraron un flujo neto de taurina en dirección retina-coroides con una K_m aparente de 3.5 mM y una V_{max} de 225 nmol/hr cm^2 . De manera similar, las células del EPR de la rata en cultivo acumulan taurina- H^3 en contra de un gradiente de concentración, a través de un mecanismo de alta afinidad dependiente de sodio (Edwards, 1977) con una K_m aparente de 16 μM y una V_{max} de 2.3 nmol/hr/ μl de células, así como por un mecanismo de baja afinidad y posiblemente por difusión simple.

Los estudios anteriormente descritos sugieren que el EPR participa en el control del paso de la taurina de y hacia la retina.

OBJETIVOS

El EPR es parte de la barrera hematorretiniana, la cual controla el transporte de diversos solutos de y hacia la retina. De particular importancia es el transporte de aminoácidos en el EPR, ya que se ha postulado que muchos de ellos funcionan en la retina como neurotransmisores o neuromoduladores (Bito y De Rousseau, 1980). El ácido glutámico y la taurina tienen un importante papel en la fisiología de la retina, el primero como neurotransmisor y agente tóxico, y la segunda parece ser necesaria para la sobrevivencia de las células fotorreceptoras. En un intento por identificar la participación del EPR como parte de la barrera hematorretiniana, el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar los sistemas de captación para la taurina y el ácido L-glutámico en el epitelio pigmentario de la retina del pollo y de la rata, durante el desarrollo.

MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con ratas Long Evans de diferentes edades (3, 5, 8, 12, 15 y 30 días, y ratas adultas (150-200 grs. de peso); así como con pollos de la variedad Rirr y Barr de 1, 2, 4 y 15 días y embriones de 7, 10, 15, 18 y 21 días de desarrollo.

Los animales previamente adaptados a la oscuridad por una hora, se decapitaron y se les enuclearon los ojos, a los cuales se les hizo un corte ecuatorial desechando la parte anterior de éste incluyendo la retina neural. El complejo epitelio pigmentario-coroides (EP) se aisló desprendiéndolo de la copa óptica con unas pinzas finas en un Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) que tiene la siguiente composición (concentraciones en mM): NaCl 118, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.17, glucosa 5.6 y NaHCO_3 35.

La acumulación de los aminoácidos L-glutamato-H³, D-aspartato-H³ y taurina-H³ se determinó incubando el EP aislado en RKB a 37 °C durante diferentes periodos de tiempo (2, 5, 10, 20 y 40 minutos). Al final de la incubación, se eliminó el medio y se lavó el tejido en RKB frío. El tejido se pesó y digirió en SDS al 1 % durante 30 minutos a 40 °C. La radiactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido, después de agregar 5 ml de tritosol, que tiene la siguiente composición: 3 gr. de 2,5-difeniloxazola (PPO), 251 ml de tritón x-100, 37 ml de etilenglicol, 106 ml de etanol y 600 ml de xilol. La concentración de los aminoácidos varió en el sistema de incubación de 5 a 1000 μM . El efecto del sodio en la captación de los aminoácidos, se estudió sustituyendo el cloruro de sodio por

cloruro de colina, y el bicarbonato de sodio por bicarbonato de potasio. Cuando se estudió el efecto de diferentes compuestos en la acumulación de los aminoácidos radiactivos, estos se agregaron al medio de incubación al mismo tiempo que el aminoácido tritiado. El efecto de inhibidores metabólicos sobre la captación de los aminoácidos se probó incubando en presencia de ouabaina, 2, 4-dinitrofenol (DNP), cianuro de potasio (KCN) y iodoacetato (Iac) a concentraciones de 0.1 a 1 mM. Asimismo, la especificidad del transporte de los aminoácidos se probó utilizando análogos de los mismos [ácido kaínico, hidroxamatos de L-aspartato y L-glutámico, ácido α -aminoadípico, ácido L-aspártico, ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina, β -alanina] a una concentración de 200 μ M a 1 mM.

La significancia de los datos experimentales se calculó utilizando el análisis de varianza simple y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan.

MATERIALES

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los aminoácidos radiactivos se obtuvieron de New England Nuclear, los inhibidores metabólicos, el PPO y análogos de los aminoácidos estudiados, de Sigma.

RESULTADOS

La acumulación de L-glutamato-H₃ en el EP, se determinó a diferentes tiempos de incubación (2 a 40 minutos) (gráfica 1). Se encontró que la acumulación máxima de glutamato-H₃ en el EPR del pollo y de la rata se alcanzó a los 20 minutos de incubación. La acumulación de glutamato-H₃ se estudió en presencia de diferentes concentraciones del aminoácido (5 - 500 μ M) (gráfica 2), observándose en el EP de pollo una saturación a altas concentraciones del mismo. El análisis cinético mostró un valor de K_m de 250 μ M y una V_{max} de 35.71 nmol/g/min. (gráfica 4). Resultados similares se encontraron en el EP de la rata, encontrándose una K_m aparente de 125 μ M y una V_{max} de 11.1 nmol/g/min (gráfica 4).

La dependencia de energía del sistema de transporte del glutamato-H₃ se determinó utilizando inhibidores metabólicos tales como Iac, DNP, KCN y ouabaina, así como efectuando la incubación a 4° C (gráfica 6). Se observó que la acumulación de glutamato-H₃ en el EPR del pollo es considerablemente inhibida por Iac (79 %) y ouabaina (82 %), mientras que el DNP causó una inhibición del 21 % y el KCN del 11 %. Al igual que en el EP del pollo, en el de la rata la acumulación del glutamato-H₃ es afectada, aunque en menor grado por Iac (35 %), ouabaina (20 %) y DNP (24 %); mientras que el KCN no tuvo ningún efecto. La incubación del tejido a 4° C mostró un fuerte efecto inhibitorio en la acumulación del glutamato-H₃, reduciéndola 84 % en el EP del pollo y 69 % en el EP de la rata.

La especificidad del sistema de transporte del glutamato se

estudió efectuando la incubación en presencia de diferentes análogos de este aminoácido, tales como L-aspartato, α -aminoadipato, hidroxamato del ácido L-glutámico, hidroxamato del ácido L-aspartico y kainato, así como en presencia del GABA y taurina (gráfica 7). La presencia de 1 mM de L-aspartato en el medio de incubación, causó una disminución en la acumulación de glutamato-H3 del 57% en el EP de ambas especies. El hidroxamato de L-aspartato (500 μ M) redujo en un 64 % la captación de glutamato-H3 en el EP del pollo y 45 % en el EP de la rata. El ácido α -aminoadípico causó una inhibición del 4 % en el EP del pollo y de 29 % en el EP de la rata. La taurina disminuyó 27 y 24 % la acumulación de glutamato-H3 en el EP del pollo y de la rata respectivamente. Mientras que en presencia de GABA se observó una inhibición no significativa (10 % y 3.2 %).

La dependencia de sodio en la acumulación de glutamato-H3 se estudió sustituyendo el cloruro de sodio por cloruro de colina (gráfica 8). La ausencia de sodio en el medio de incubación inhibió la acumulación de glutamato-H3 en un 80 y 65 % en el EP de pollos y ratas adultos respectivamente. La dependencia de sodio en la captación de glutamato-H3 se observó durante todos los estadios de desarrollo estudiados.

La presencia de el sistema de transporte del glutamato en el EP, se estudió durante el desarrollo del pollo y de la rata (gráfica 8). Estos estudios revelaron que la aparición del sistema de transporte es diferente en estas especies. En el pollo, la capacidad del EP para acumular el aminoácido es mayor que en el de la rata y cambia durante el desarrollo ontogenético.

Al 7o día de desarrollo embrionario, la acumulación de glutamato alcanza valores de 60 nmol/g, y disminuye continuamente hasta alcanzar a los 2 días de edad postnatal 16 nmol/g. En el EP de la rata, durante los primeros días de edad, los niveles de acumulación de glutamato son tres veces menores que los observados en el EP de embriones de pollo. La acumulación de glutamato-H3 presentó pequeñas variaciones del 5o al 15o día de edad, observándose en el animal adulto valores similares a los encontrados en el EP del pollo después de la eclosión. Se observó que existe dependencia de sodio en la captación de glutamato, durante todos los los estadios de desarrollo estudiados.

D-aspartato

Dado el importante papel metabólico del glutamato, se estudió la acumulación de D-aspartato-H3, análogo no metabolizable del mismo, del que se tiene evidencia que ocupa los sitios de captación del glutamato en el SNC y en la retina (Miller y Slaughter, 1985).

La acumulación de D-aspartato-H3 en el EP del pollo es cuatro veces mayor que en el EP de la rata, sin embargo en ambas especies se observan los valores máximos a los 20 minutos de incubación (gráfica 1).

La acumulación de D-aspartato-H3 en el EP, se satura a una concentración externa del aminoácido de 500 μM (gráfica 2). La gráfica de dobles recíprocas mostró una K_m aparente de 250 μM para ambas especies, con una V_{max} de 16.65 nmol/g/min en el EP del pollo y de 8.33 nmol/g/min en el EP de la rata (gráfica 4).

La captación de D-aspartato-H3 en el EP del pollo en presencia

†

de inhibidores metabólicos fue afectada de la siguiente manera: el Iac y la ouabaina redujeron la captación en un 79 % y 82 % respectivamente, el KCN y el DNP en un 52 % y 40 % respectivamente. Asimismo la incubación a 4° C causó una inhibición del 95 % (gráfica 6). La captación de D-aspartato-H3 en el EP de la rata, a diferencia con respecto de lo que ocurre en el pollo, se afectó en menor grado por los inhibidores metabólicos estudiados, observándose una inhibición del 50, 48 y 31 % por ouabaina, Iac y DNP respectivamente. Mientras que el KCN no tuvo ningún efecto, la incubación a 4 °C inhibió la acumulación de D-aspartato-H3 en un 80 % (gráfica 6).

La acumulación de D-aspartato-H3 en el EP del pollo en presencia de análogos del glutamato y otros aminoácidos, fue reducida por L-aspartato 73.7 % e hidroxamato de L-aspartato 71.4 %. En el EPR de la rata, el L-aspartato inhibió la acumulación de D-aspartato 68 % y el hidroxamato de L-aspartato 60 % (gráfica 7).

La captación del D-aspartato-H en el EP de ambas especies, presentó una fuerte dependencia de sodio. La ausencia de sodio en el medio de incubación redujo en un 80 a 90 % la acumulación de D-aspartato-H3, tanto en los estadios tempranos de desarrollo como en el estado adulto (gráfica 8).

Durante el desarrollo ontogenético del pollo, la captación de D-aspartato-H3 presentó cambios similares a los observados para el glutamato-H3. Desde el 7o día de desarrollo, la captación disminuyó continuamente hasta el 18o día desarrollo embrionario (de 100 nmol/g a 40 nmol/g), sin embargo incrementa notablemente

en el día de la eclosión (70 nmol/g) y después disminuye rápidamente durante los cuatro primeros días después de la eclosión y permanece constante hasta el estado adulto (10 nmol/g) (gráfica 8).

En el EP de la rata, la acumulación de D-aspartato-H₃, no presentó cambios significativos durante los periodos de desarrollo estudiados (gráfica 8).

TAURINA

Las características de la acumulación de taurina-H₃ en el EP, se determinaron midiendo la captación del aminoácido a diferentes tiempos de incubación (2, 5, 10, 20 y 40 minutos) y a diferentes concentraciones de taurina (5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 μ M). Encontramos que la captación de taurina en el EP es saturable con respecto al tiempo de incubación. La máxima captación se observó a los 20 minutos de incubación (gráfica 1), y se saturó a altas concentraciones del aminoácido (500 μ M) (gráfica 3); observándose en el EP del pollo una Km aparente de 166 μ M con una Vmax de 20.8 nmol/g/min, mientras que en el EP de la rata, el sistema de transporte presentó una Km aparente de 250 μ M y Vmax de 8.8 nmol/g/min (gráfica 5).

La dependencia de energía del sistema de transporte de la taurina-H₃ se determinó incubando en presencia de inhibidores metabólicos (Iac, DNP, KCN y ouabaina) y a bajas temperaturas. Encontramos que la captación de taurina en el EP del pollo se inhibió notablemente por KCN (82 %) y bajas temperaturas (91 %), la ouabaina y el DNP disminuyeron la acumulación de taurina-H₃ un 68 y 41 % respectivamente, mientras que la inhibición provocada

por el Iac fue del 33 % (gráfica 6). Asimismo, la acumulación de taurina presentó una alta dependencia de sodio, la ausencia del sodio en el medio de incubación redujo su acumulación en un 85 % (gráfica 9).

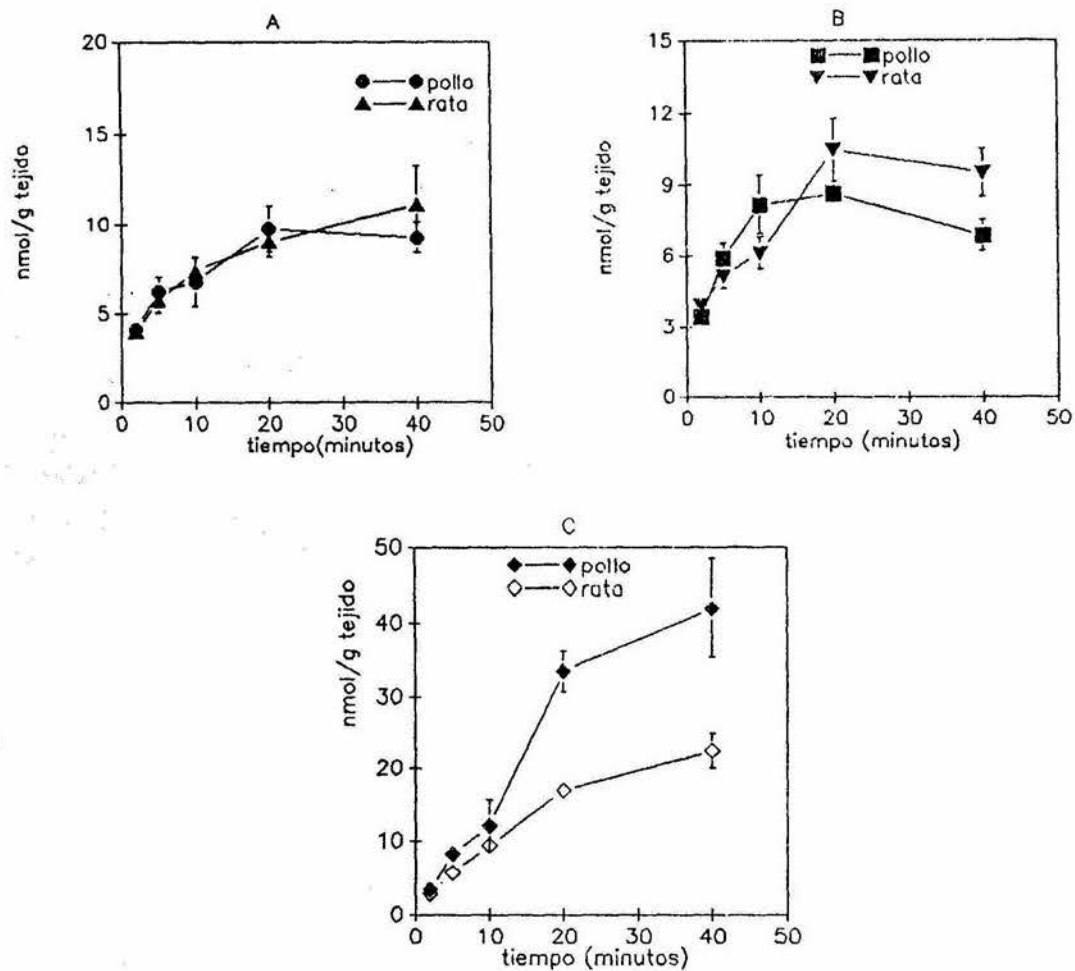
La acumulación de taurina-H en el EP de la rata, se inhibió notablemente a bajas temperaturas (88 %), sin embargo, fue menos afectada que en el EP del pollo por los inhibidores metabólicos, los que la inhibieron entre un 30-40 %, observándose una leve inhibición por Iac (18 %) (gráfica 6). La captación de taurina presentó una clara dependencia de sodio, ya que la ausencia de sodio en el medio de incubación causó una inhibición del 85 % (gráfica 9).

La especificidad del sistema de transporte de la taurina se estudió incubando en presencia de diferentes aminoácidos, tales como β -alanina, GABA, glicina y glutamato (gráfica 7). Estos estudios mostraron que la β -alanina (1mM) ejerce un potente efecto inhibitorio en la acumulación de taurina-H₃, condiciones en las que la acumulación se redujo en un 50 % y 61 % en el EP del pollo y de la rata respectivamente. El GABA tuvo un efecto inhibitorio del 45 % en el EP del pollo y de 34 % en el EP de la rata. Los aminoácidos glicina y glutamato disminuyeron la acumulación de taurina 19 % y 45 %, respectivamente, en el EP del pollo, mientras que en el EP de la rata la acumulación de taurina-H₃ no se vió afectada por estos aminoácidos.

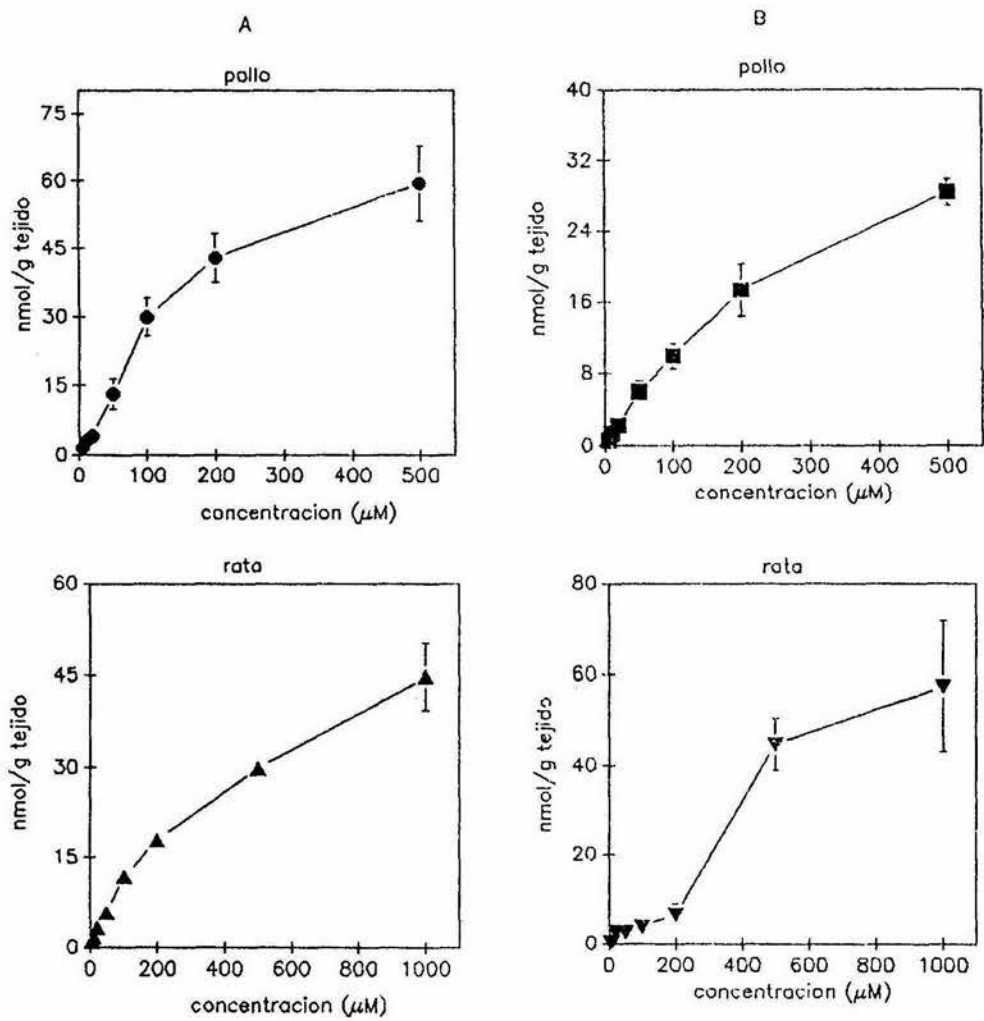
El sistema de transporte de la taurina, se estudió durante el desarrollo del pollo y de la rata (gráfica 9). Es interesante que los niveles de la acumulación en el estado adulto fueron

similares (19 nmol/g) en ambas especies, sin embargo, existen diferencias durante el desarrollo de las dos especies. En el EP del pollo los niveles de taurina-H3 varían durante el desarrollo embrionario. Al 6o y 7o día de incubación, los niveles de taurina acumulada son de 30 nmol/g y aumentan 100 % del décimo al doceavo día de desarrollo embrionario y disminuye rápidamente, presentando niveles de 30 nmol/g a los 15 días. En el día de la eclosión se observó una ligera disminución, alcanzando a los 4 días los valores observados en el adulto (20 nmol/g).

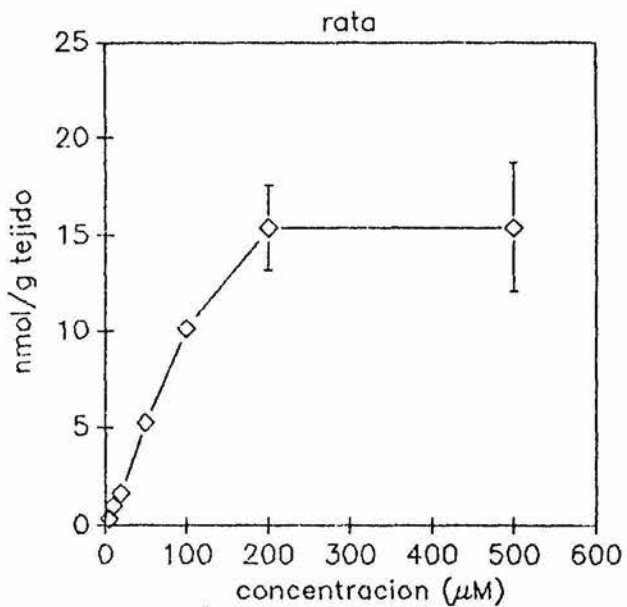
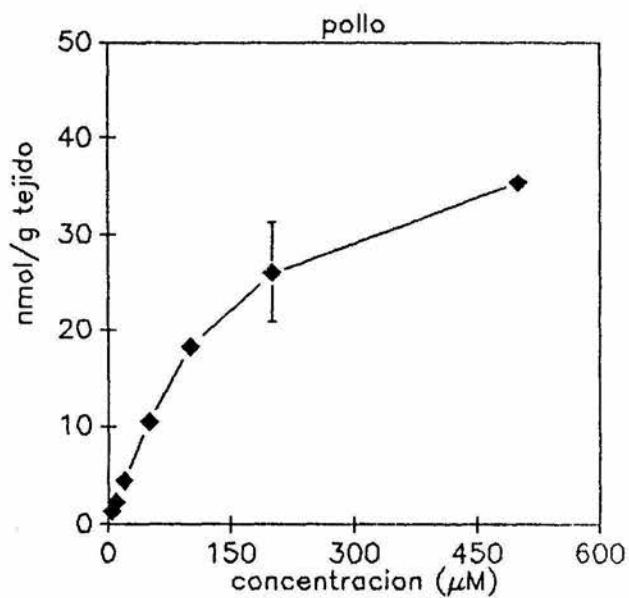
En la rata, los niveles de acumulación de taurina-H3 se mantienen constantes del 3o al 8o día de edad postnatal (20 nmol/g), aumenta notablemente al doceavo día, observándose valores de 37 nmol/g, y disminuye continuamente, alcanzando los niveles del animal adulto a los 15 días de edad postnatal (16 nmol/g) (gráfica 9).



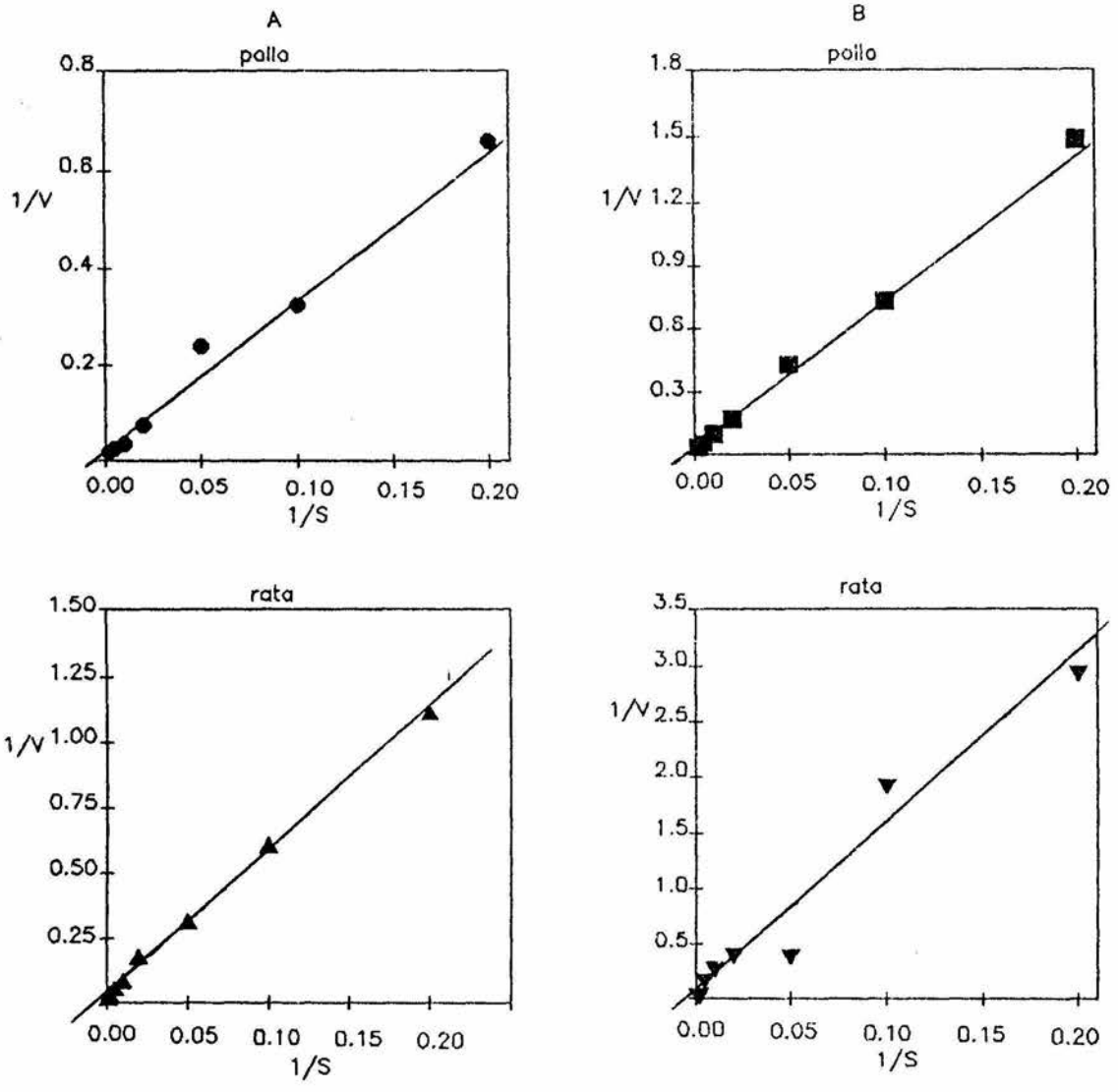
Gráfica 1. Acumulación de (A), glutamato-H3; (B), D-aspartato-H3; (C), taurina-H3 a diferentes tiempos (2 a 40 minutos) en el EP de pollos y ratas. La concentración externa de los aminoácidos usada fué de 20 μ M. Cada punto representa el promedio de cuatro experimentos +/- el error estándar.



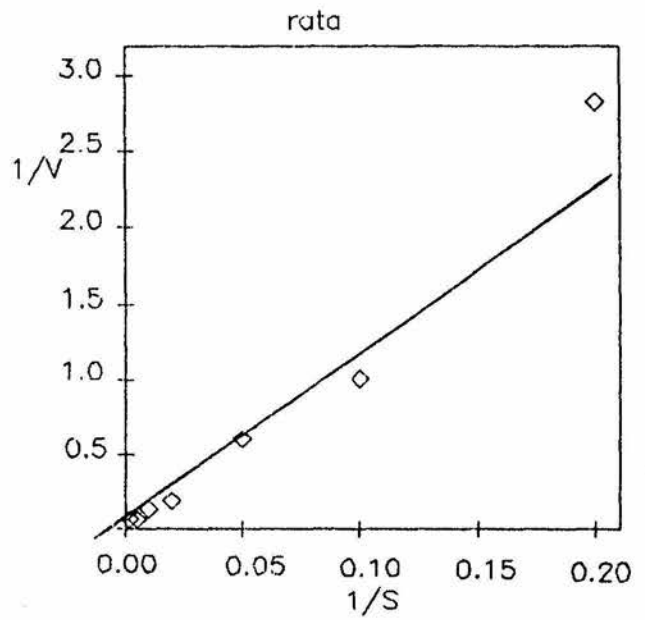
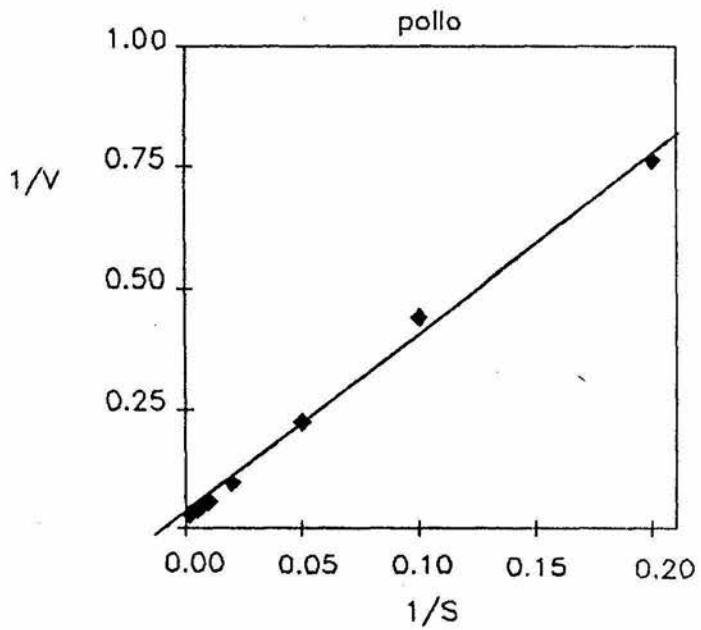
Gráfica 2. Acumulación de glutamato-H3 (A) y de D-aspartato-H3 (B) en el EP como una función de su concentración extracelular. El tejido se incubó durante 2 minutos a 37 ° C. Cada punto es el promedio de 4 experimentos +/- el error estándar.



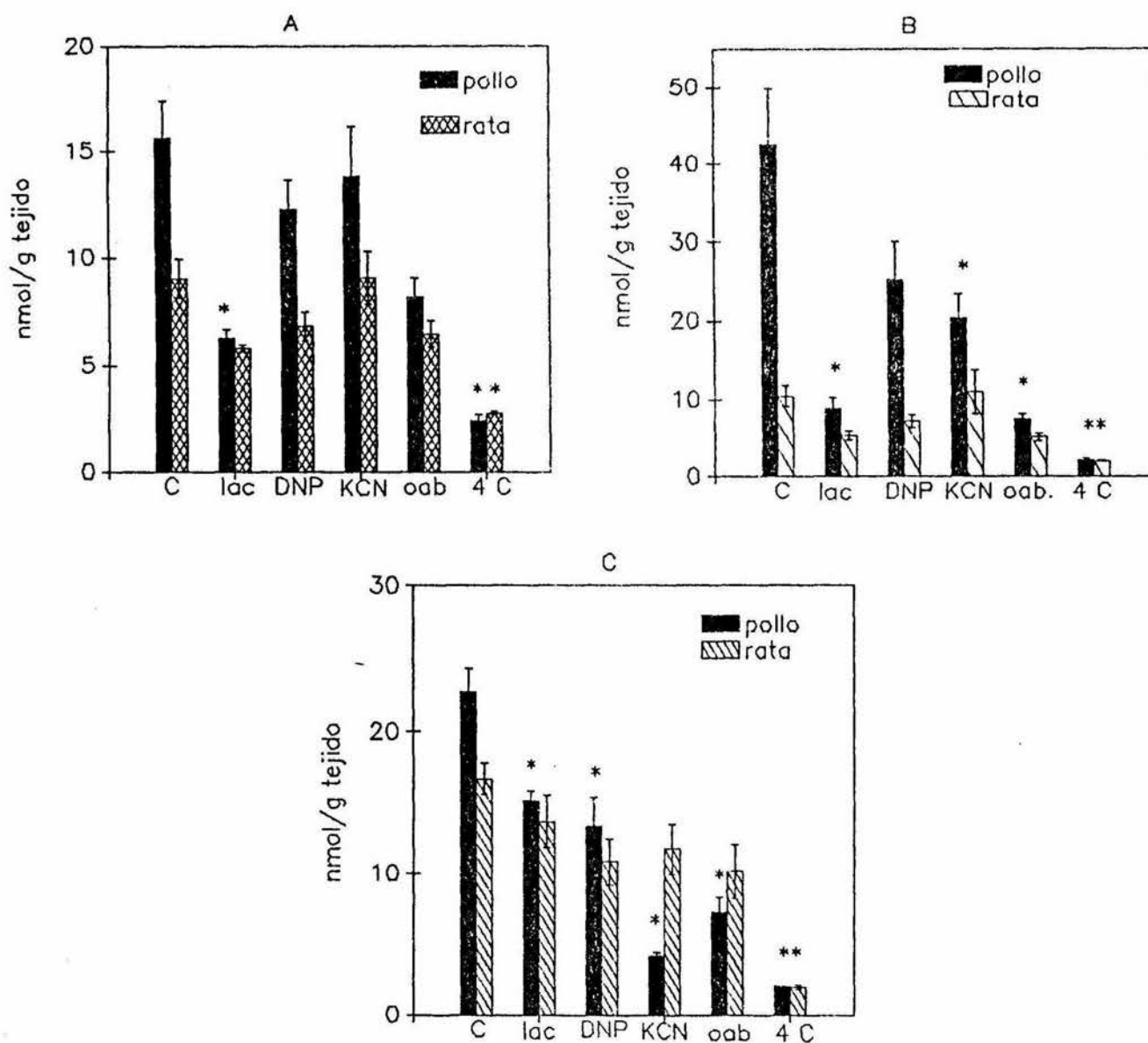
Gráfica 3. Acumulación de taurina-H3 a diferentes concentraciones. El tejido se incubó a 37 °C durante 2 minutos. Cada punto es el promedio de 3-5 experimentos +/- el error estándar. Los puntos en los que no aparece el error es porque estos son más pequeños que el punto.



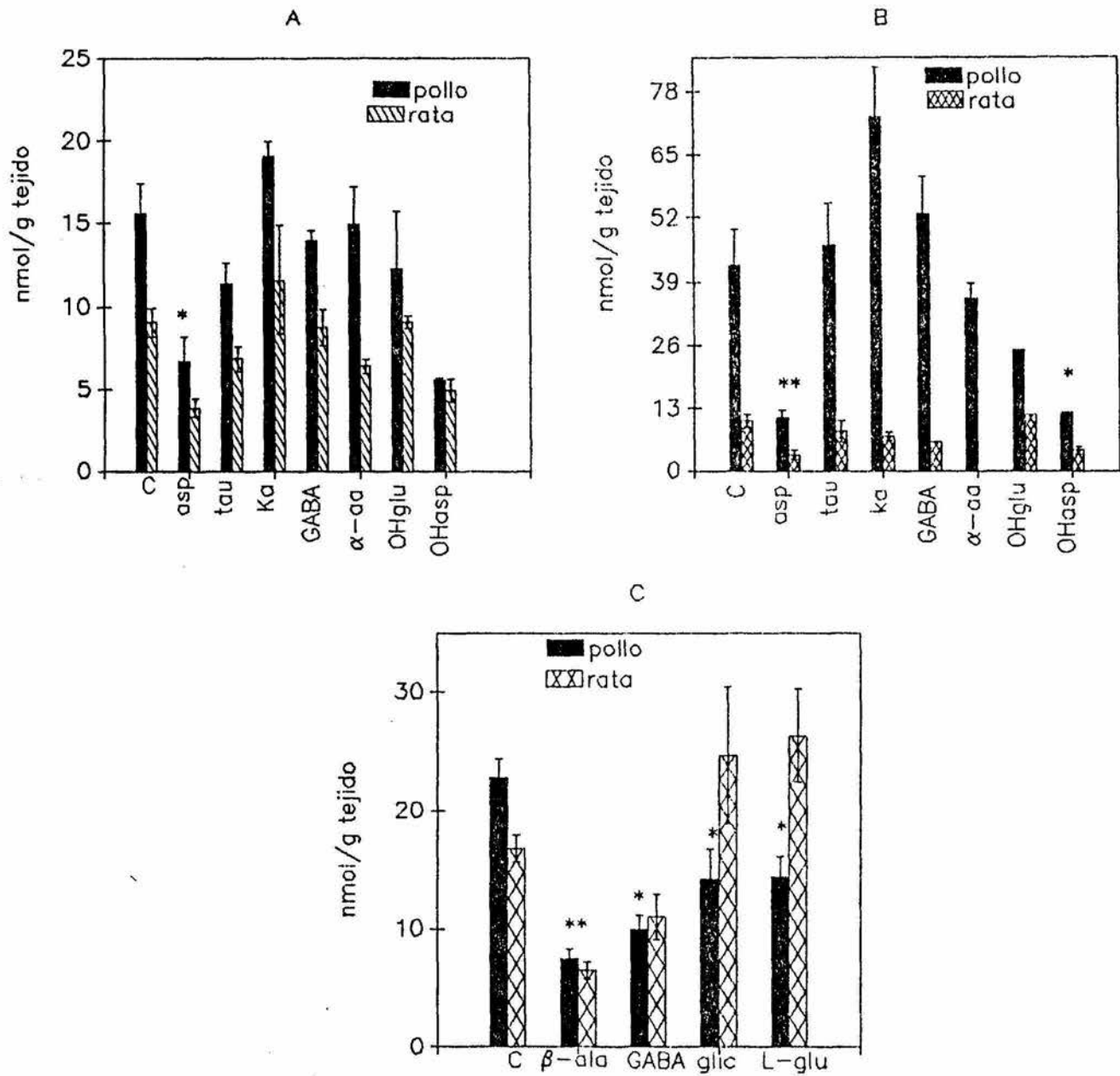
Gráfica 4. Análisis de Lineweaver-Burk de la acumulación de L-glutamato-H3 (A) y de D-aspartato-H3 (B) en el EP. Los puntos se obtuvieron de la gráfica 2.



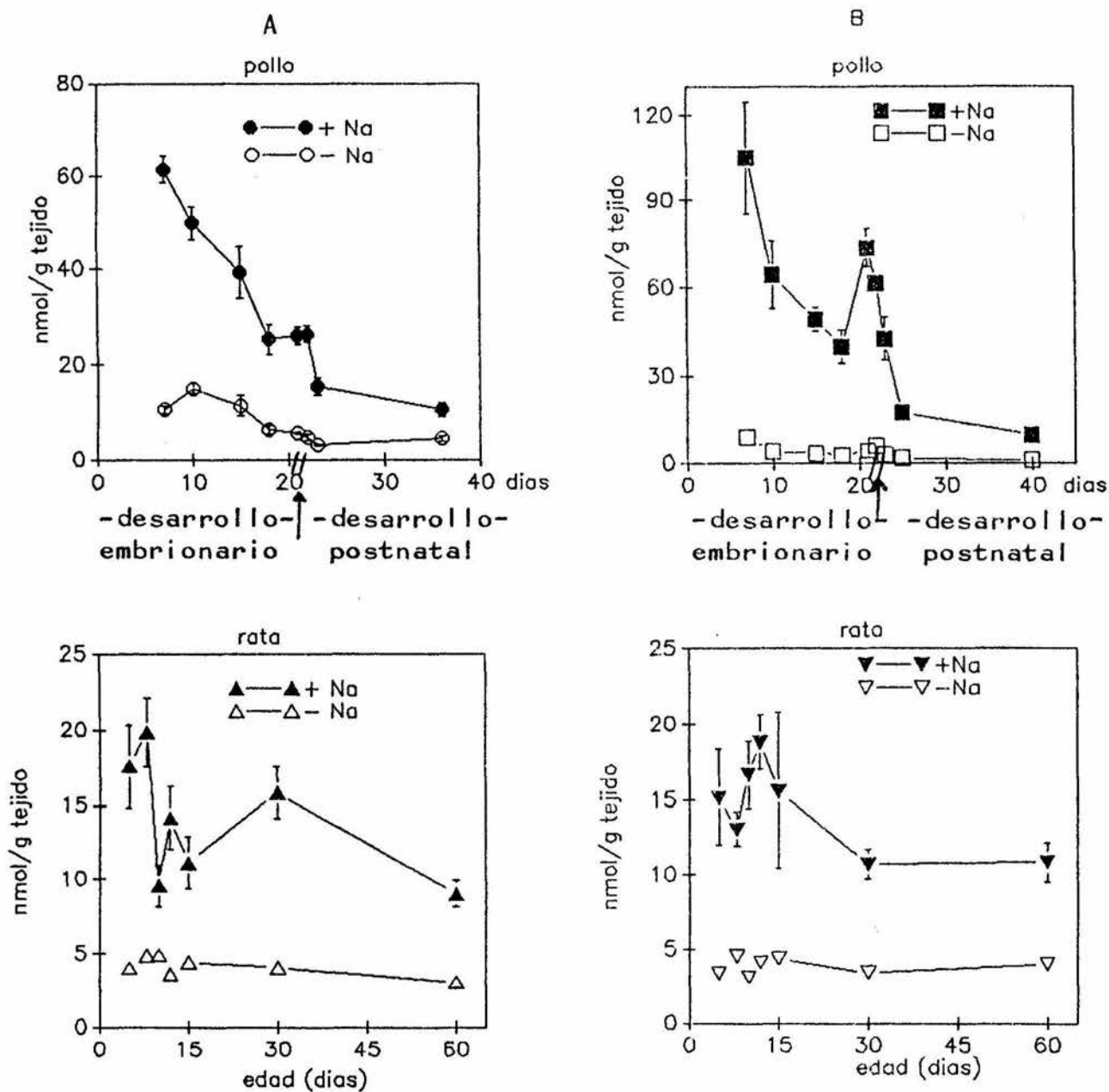
Gráfica 5. Acumulación de taurina en el EP del pollo y de la rata utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk. Los puntos fueron obtenidos de la gráfica 4.



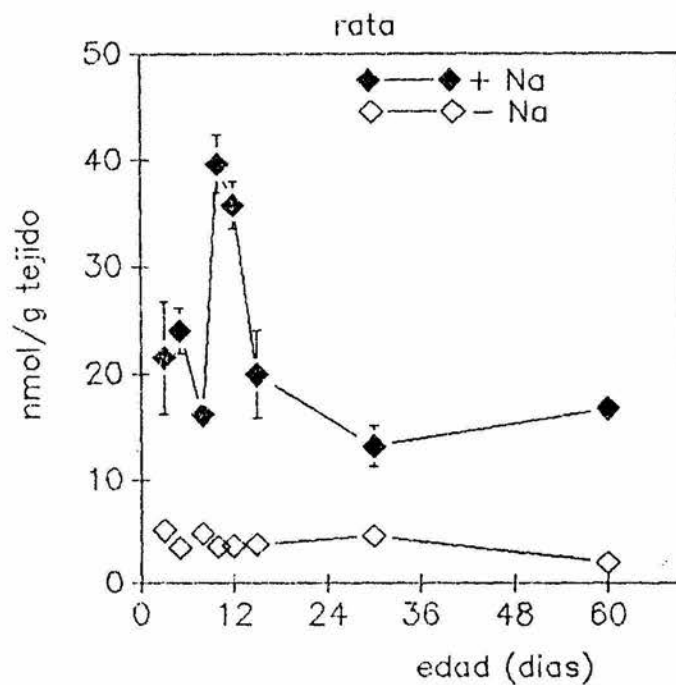
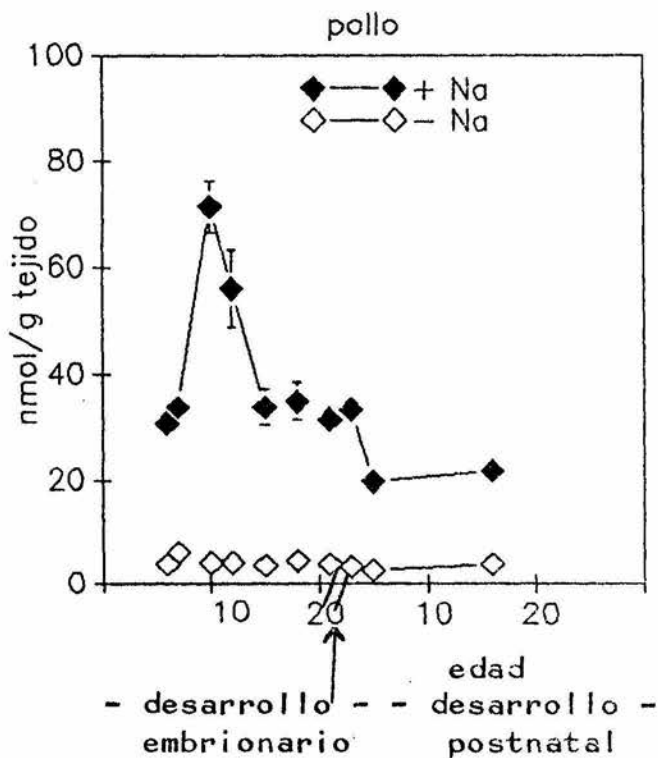
Gráfica 6. Efecto de inhibidores metabólicos y de la incubación a 4 ° C en la acumulación de (A), glutamato-H3; (B), D-aspartato-H3; (C), taurina-H3 en el EP. La concentración de aminoácido usada fue de 20 μ M, mientras que la concentración del Iac, DNP y KCN fue de 1 mM y ouabaina de 0.1 mM. El tejido se incubó durante 20 minutos a 37 ° C. Los valores son el promedio de 3-5 experimentos +/- el error estándar. * significancia estadística a un valor de $\alpha = 0.05$



Gráfica 7. Captación de (A), glutamato-H3; (B), D-aspartato-H3; (C), taurina-H3 en el EP en presencia de compuestos análogos. La concentración del aminoácido tritiado fue de 20 μ M, y la de los análogos de 200 μ M a 1 mM. El tiempo de incubación fue de 20 minutos. Los datos son el promedio de 3-4 experimentos +/- el error estándar. * significancia estadística a un valor de $\alpha = 0.05$



Gráfica 8. Captación de (A), glutamato-H3; (B), D-aspartato-H3 en el EP durante el desarrollo del pollo y de la rata. El tejido se incubó durante 20 minutos a una concentración del aminoácido de 20 μ M. La flecha indica la eclosión del pollo. Cada punto es el promedio de 3-8 experimentos +/- el error estándar.



Gráfica 9. Acumulación de taurina-H3 en el EP del pollo y de la rata durante su desarrollo. La concentración de taurina usada fue de $20 \mu\text{M}$ y el tiempo de incubación 20 minutos. La flecha indica la eclosión del pollo. Cada punto representa la media de 4-8 experimentos +/- el error estándar.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este estudio se caracterizó el sistema de transporte del L-glutamato y de la taurina en el EP del pollo y de la rata. Ambas especies difieren en la estructura de la retina, principalmente en cuanto a la vascularización de las mismas. Esta diferencia puede ser importante para determinar la función del EP como barrera hematorretiniana.

El EP del pollo y de la rata acumulan glutamato-H₃ a través de un sistema de captación saturable, dependiente de sodio y de energía. En el presente estudio se encontró que el inhibidor metabólico iodoacetato tiene un potente efecto inhibitor en la captación del glutamato-H₃ en el EP de ambas especies, resultados que sugieren que la energía producida por la vía glucolítica tiene un papel importante en el transporte del glutamato. La captación de glutamato-H se inhibió notablemente por ouabaina, efecto que puede deberse a la dependencia de sodio del sistema. Nuestros resultados coinciden con los previamente reportados por Pautler y Tengerdy (1986) en el EP del bovino. Estos autores demostraron un flujo unidireccional de glutamato en dirección retina-coroides, el cual es reducido por bajas concentraciones externas de sodio, potasio y calcio, y por la presencia de ouabaina. Asimismo, el transporte de glutamato en otros epitelios es mediado por un sistema de alta afinidad, el cual es inhibido por la ausencia de sodio y por la presencia de ouabaina (Lerner y Steinke, 1977). En el SNC, el glutamato es cotransportado con sodio en células gliales por un sistema de alta afinidad ($K_m = 22 \mu M$), el que participa en la eliminación del neurotransmisor del

espacio sináptico, terminando la acción del mismo (Barbour, Brew y Attwell, 1988).

Nuestros resultados indican que el sistema que transporta glutamato tiene preferencia por aminoácidos acídicos, particularmente por L-glutamato y L-aspartato, y muestra una afinidad menor por la taurina, mientras que no es modificado por ácido kaínico, ácido α -aminoadípico e hidroxamato del ácido glutámico. Resultados que están de acuerdo con los de Pautler y Tengerdy (1986) en EP de bovino, en el que reportaron que el L-glutamato y el L-aspartato son transportados por un acarreador común, que tiene baja afinidad por aminoácidos básicos y neutros. Resultados semejantes se observan en el epitelio intestinal del pollo (Lerner, 1984).

Es interesante que la capacidad de captación del ácido glutámico por el EP presenta cambios durante el desarrollo. El aminoácido es acumulado en mayor cantidad en el EP de embriones de pollo de 7 días de desarrollo, y disminuye gradualmente hasta los dos días de edad póstnatal, tiempo en el que alcanza los valores observados en el adulto. Resultados similares, aunque menos notorios se observan en el EP de la rata. Estos hallazgos sugieren un papel importante del EP en la barrera hematorretiniana. Resultados similares se han observado en el cerebro, en el que la barrera hematoencefálica de animales inmaduros es menos restrictiva en la acumulación de varios aminoácidos, que la de animales adultos (Lajtha y Sersen, 1980; Rassin, et al., 1977). Resulta interesante que el glutamato es considerado neurotransmisor en la retina y que presenta efectos

neurotóxicos, por lo que el establecimiento de estos sistemas de captación en el EP es relevante para el funcionamiento normal de la retina. Por lo anterior podría inferirse que similarmente a lo que ocurre en la barrera hematoencefálica, la mayor captación de glutamato en el EP de animales inmaduros es debido a que la barrera hematorretiniana no se encuentra completamente diferenciada, y por lo tanto es menos restrictiva. El posible papel del EP como parte de la barrera hematorretiniana aparece temprano durante el desarrollo, lo que puede estar en relación con la diferenciación del EP mismo. Stroeve y Mitashov (1983) establecen la diferenciación de las células del EP a los 14 y 18 días de desarrollo embrionario en el pollo y la rata, respectivamente. Los resultados obtenidos con el D-aspartato-H³, el cual es un análogo no metabolizable del L-glutamato, indicaron que la captación de D-aspartato en el EP de ambas especies, al igual que para el L-glutamato, es saturable con respecto al tiempo de incubación y a la concentración del aminoácido, observándose constantes cinéticas similares. El sistema de transporte parece presentar la misma afinidad para el D-aspartato que para el glutamato. Se observó que la acumulación tanto del glutamato como del D-aspartato fueron afectadas de manera similar por los inhibidores metabólicos y presentaron afinidad similar por distintos análogos. Asimismo, tanto en el EP del pollo como en el de la rata, el patrón de la captación del D-aspartato-H³ y L-glutamato-H³ son similares. Estos resultados hacen pensar que el D-aspartato puede ser transportado por el mismo sitio que el L-glutamato, como se ha reportado en SNC y en la retina (Miller y Slaughter, 1985), o bien ser transportado por otro sitio que

tiene características similares al sistema de transporte del glutamato.

Como el ácido glutámico, la taurina es un aminoácido importante en la fisiología de la retina. La primera evidencia que se tuvo de que el EP tiene la capacidad de acumular taurina, la aportó el estudio de Lake, Marshall y Voaden (1977), quienes por autorradiografía, localizaron la acumulación de 3-H-taurina en varias capas retinianas incluyendo el EP.

La taurina-³H es acumulada por el EP del pollo y de la rata por un sistema saturable mediado por un acarreador, dependiente de sodio y de energía. Los resultados sugieren que tanto el ATP producido por la vía oxidativa, como el gradiente de sodio establecido por la acción de la ATPasa de sodio-potasio son requeridos para el transporte de taurina en el EP, lo que está de acuerdo con lo reportado por Miller y Steinberg (1976) en el EP de la rana, quienes demostraron la presencia de un flujo neto de taurina en dirección retina-coroides por un mecanismo de transporte activo, saturable con una Km aparente de 3.5 mM y una Vmax de 225 nmol/cm²hr., el cual es bloqueado por ouabaina. Sin embargo, difieren de los resultados de Edwards (1977), en células del EP de la rata en cultivo, en los que se reportó un sistema de alta afinidad con una Km de 16 μM y una Vmax de 2.3 nmol/h./μl células, el cual es inhibido fuertemente por iodoacetato y ouabaina.

Nuestros estudios demostraron que la captación de taurina en el EP del pollo y de la rata es parcialmente específico, pues tiene afinidad por aminoácidos neutros como la β-alanina y el

GABA. Resultados similares se observan en otros tejidos (Karl, 1990; Lerner, 1984) donde se ha determinado que los aminoácidos neutros son transportados por dos sistemas diferentes: uno que transporta leucina, triptófano, alanina, prolina, glicina y metionina y otro sitio que transporta β -alanina, GABA, prolina y glicina .

Los niveles de acumulación de taurina durante el desarrollo embrionario es mayor que en el de los animales adultos. Resultados similares se han reportado en SNC, en donde la concentración de taurina en el cerebro de animales inmaduros es mayor que las concentraciones encontradas en animales adultos (Rassin, et al., 1977). Asimismo, estudios realizados por Levi (1970) en rebanadas de cerebro, mostraron que las constantes de afinidad para el transporte de GABA, lisina y glutamato permanecen constantes durante el desarrollo embrionario, pero la capacidad de los mismos decremента.

Nuestros estudios están de acuerdo también con los de Baskin, Cohn y Kocsis (1976), quienes mostraron que los niveles endógenos de taurina decremента con la edad, en el cristalino y la retina, observándose en los animales viejos una concentración menor de taurina con relación a los animales de 12 meses de edad .

Los posibles eventos que podrían explicar la diferencia en los niveles de la acumulación de los aminoácidos durante el desarrollo, son los siguientes: que los sistemas de captación de los aminoácidos modifiquen su capacidad de acumulación; que modifiquen su afinidad por el aminoácido; o bien que sean sustituido por otros sistemas de transporte.

Aunque nuestros resultados difieren con otros previamente

reportados, es importante señalar que éstos corresponden a estudios realizados en otras especies y las diferencias observadas pueden deberse a propiedades particulares de los sistemas de transporte en las diversas especies de vertebrados. Sin embargo, tanto en el pollo como en la rata, los cuales presentan diferentes tipos de retina en cuanto a la vascularización de las mismas, nuestros resultados son indicativos de que el EPR juega un papel importante en el establecimiento de la barrera hematorretiniana. Sin embargo, se requiere de estudios posteriores para dilucidar esta función, tales como la localización de diferentes transportadores en las membranas apical y basal de esta célula.

BIBLIOGRAFIA

Barbour, B. Brew, H. and Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. Nature 335, 433.

Baskin, S. I., Cohn, E. M. and Kocsis, J. J! (1976). Taurine changes in visual tissues with age. in Huxtable, R. and Barbeau, A., editors. Taurine. Raven Press, New York.

Berman, E. R. (1979). Biochemistry of the retinal pigment epithelium. In Zinn, K. M. and Marmor, M. F. editors. The retinal pigment epithelium. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Berson, E. L. et al. (1976). Retinal degeneration in cats fed casein. II. Supplementation with methionine, cysteine, or taurine. Invest. Ophthalmol. 15, 52.

Besharse, J. C., Hollyfield, J. G. and Rayborn, M. E. (1977). Photoreceptor outer segments: accelerated membrane renewal in rods after exposure to light. Science 196, 536.

Bito, L. and DeRousseau, C. J. (1980). Transport functions of the blood-retinal barrier system and the microenvironment of the retina. In Cunha-Vaz, J. editor. The Blood-Retinal Barriers. Plenum Press, New York and London.

Bok, D. and Young, R. W. (1979). Phagocytic properties of the retinal pigment epithelium. In Zinn, K. M. and Marmor, M. F. editors. The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univers. Press, Cambridge, Massachusetts.

Brandon, C. and Lam, D. M-K. (1983). L-glutamic acid: a neurotransmitter candidate for cone photoreceptors in human and rat retinas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5117.

Chan, K. W., Chan, L. W. and Yew, D. T. (1984). Labelled leucine uptake in the visual cells and pigment epithelium young albino rats in response to different light-dark cycles. Acta Histochem. 75, 1.

Clark, V. M. (1986). The cell biology of the retinal pigment epithelium. In Adler, R. and Farber, D. editors. The Retina. A Model for Cell Biology Studies. Part 11. Academic Press, Inc, Orlando, Florida.

Crosson, C. E. and Pautler, E. L. (1982). Glucose transport across isolated bovine pigment epithelium. Exp. Eye Res. 35, 371.

Cunha-Vaz, J. (1980). Sites and functions of the blood-retinal barriers. In Cunha-Vaz, J. editor. The Blood-Retinal Barriers. Plenum Press, New York and London.

Curtis, D. R. and Watkins, J. C. (1960). The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids. J. Neurochem. 6, 117.

Edwards, R. B. (1977). Accumulation of taurine by cultured retinal pigment epithelium of the rat. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 16(3), 201.

Ehinger, G. (1973). Glial uptake of taurine in the rabbit retina. Brain Res. 60, 512.

Farber, D. and Adler, R. (1986). Issues and questions in cell biology of the retina. In Adler, R. and Farber, D. editors. The Retina. A model for cell biology studies. Part I. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.

Feeney, L. (1973). The fagolisosome system of the pigment epithelium. A key to retinal disease. Invest. Ophthalmol. 12, 635.

Fitzpatrick, T. B. and Quevedo, W. C., Jr. (1971). Biological processes underlying melanin pigmentation and pigmentary disorders. In Modern trends in dermatology, ed. p. Borrie, London: Butterworth.

Garcia, R. I., Szabó, G. and Fitzpatrick, B. (1979). Molecular and cell biology of melanin. In Zinn, K. M. and Marmor, M. F., editors. The retinal pigment epithelium. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

Hayes, K. C., Rabin, A. R., Schmidt, S. Y. and Watson, G. (1976). Retinal degeneration in cats fed casein. II. Supplementation with methionine, cysteine, or taurine. Invest. Ophthalmol. 15 (1), 52.

Ishida, A. T. and Fain, G. L. (1981). D-aspartate potentiates the effects of L-glutamate on horizontal cells in goldfish retina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(9), 5890.

Iuvone, P. M. (1986). Neurotransmitters and neuromodulators in the retina: regulation, interactions and effects cellular. In Adler, R. and Farber, D. editors. The Retina. A model for cell biology studies. Academic Press Inc. Orlando, Florida.

Johnson, J. L. (1978). The excitant aminoacids glutamic and aspartic acid as transmitter candidates in the vertebrate central nervous system. Prog. Neurobiol. 10, 155.

Karl, P. I. and Fisher, S. E. (1990). Taurine transport by microvillous membrane vesicles and the perfused cotyledon of the human placenta. Am. J. Physiol. 258 (Cell Physiol. 27), 443.

Kennedy, A. J. and Voaden, M. J. (1976). Studies on the uptake and release of radioactive taurine by the frog retina. J

Neurochem. 27, 131.

Khatami, M. (1987). Carrier-dependent and carrier-independent uptake of myo-inositol in cultured retinal pigment epithelial cells: activation by heat and concentration. Biochem. Cell Biol. 66 (9), 942.

Khatami, M. (1988). Na⁺-linked active transport of ascorbate into cultured bovine retinal pigment epithelial cells: heterologous inhibition by glucose. Membr. Biochem. 7, 115.

Kramer, J. H. Chovan, J. P. and Schaffer, S. W. (1981). Effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. Am. J. Physiol. 240, H238.

Kuwabara, T. (1969). Blood vessels in the normal retina. In Straatsma, B. R. et al. editors. The Retina. Morphology, Function and Clinical Characteristic. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

Kuwabara, T. (1979). Species differences in the retinal pigment epithelium. In Zinn, M. and Marmor, M. F. editors. The Retinal Pigment Epithelium. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Lake, N. Marshall, J. and Voaden, M. J. (1977). The entry of taurine into the neural retina and pigment epithelium of the frog. Brain Res. 128, 497.

Lasater, E. M., Dowling, J. E. and Ripps, H. (1982). Pharmacological properties of isolated and cultured horizontal cells of the skate. Invest. Ophthalmol. Vision Sci. Suppl. 22, 81.

Lerner, J. (1984). Cell membrane aminoacid transport processes in the domestic fowl (gallus domesticus). Comp. Biochem. Physiol. 78A(2), 205.

Lerner, J. and Steinke, D. L. (1977). Intestinal absorption of glutamic acid in the chicken. Comp. Biochem. Physiol. 57 A, 11.

Levi, G. (1970). Cerebral aminoacid transport in vitro during development: a kinetic analysis. Archs. Biochem. Biophys. 138, 347.

Lucas, D. R. and Newhouse, J. P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina, AMA Arch. Ophthalmol. 57, 193.

Masterson, E. and Chader, G. J. (1981). Characterization of glucose transport by cultured chick pigmented epithelium. Exp. Eye Res. 32, 279.

Miller, S. S., Hughes, B. A. and Machen, T. E. (1982). Fluid transport across retinal pigment epithelium is inhibited by cyclic AMP. Proc Natl. Acad. Sci. USA 79, 211.

Miller, R. F. and Slaughter, M. M. (1985). Excitatory amino acids receptors in the vertebrate retina. In Morgan, W. W. editor. Retinal Transmitters and Modulators: Models for the Brain. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Miller, S. and Steinberg, R. H. (1976). Transport of taurine, L-methionine and 3-o-methyl-D-glucose across frog retinal pigment epithelium. Exp. Eye Res. 23, 177.

Mund, M. L. and Rodrigues, M. M. (1979). Embryology of the human retinal pigment epithelium. In Zinn, K. M. and Marmor, M. F. editors. The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univers. Press., Cambridge, Massachusetts.

O'Brien, P. J. (1976). Rhodopsin as a glycoprotein: a possible role for the oligosaccharide in phagocytosis. Exp. Eye Res. 23, 127.

Oja, S. S. and Kontro, P. (1983). Taurine. In Lajtha, A. editor. Handbook of Neurochemistry. Metabolism in the Nervous System, vol. 3. Plenum Press, New York and London.

Olney, J. W. (1982). The toxic effects of glutamic and related compounds in the retina and the brain. Retina 2, 341.

Orr, H. T., Cohen, A. I. and Lowry, O. H. (1976). The distribution of taurine in the vertebrate retina. J. Neurochem. 26, 609.

Pardridge, W. M. (1979). Regulation of amino acid availability to brain: selective control mechanisms for glutamate. In Filer, L. J. et al. Glutamic Acid: advances in biochemistry and physiology. Raven, New York.

Pasantés-Morales, H., Ademe, R. M. and Quesada, O. (1981). Protective effect of taurine on the light induced disruption of isolated frog rod outer segments. J. Neurosci. Res. 6, 337.

Pasantés-Morales, H., Klethi, J. Urban, P. F. and Mandel, P. (1974). The effect of electrical stimulation, light, and amino acids on the efflux of ³⁵S-taurine from the retina of domestic fowl. Exp. Brain Res. 19, 131.

Pasantés-Morales, H. (1985). Taurine function in excitable tissues: the retina as a model. In Morgan, W. W. editor. Retinal transmitters and modulators: models for the brain. C. R. C. Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Pascuzzo, G. J., Johnson, J. E. and Pautler, E. L. (1980). Glucose transport in isolated mammalian pigment epithelium. Exp. Eye Res. 30, 53.

Pautler, E. L. and Tengerdy, C. (1986). Transport of amino acids by the bovine pigment epithelium. Exp. Eye Res. 43, 207.

Potts, A. M., Modrell, R. W. and Kingsbury, C. (1960). Permanent fractionation of the ERG by sodium glutamate. Am. J. Ophthalmol. 50, 900.

Rassin, D. K., Sturman, J. A. and Gaull, G. E. (1977). Taurine in developing rat brain: subcellular distribution and association with synaptic vesicles of (35S)taurine in maternal, fetal and neonatal rat brain. J. Neurochem. 28, 41.

Reddy, V. N., Chakrapani, B. and Lim, C. P. (1977). Blood-vitrous barrier to amino acids. Exp. Eye Res. 25, 543.

Schmidt, S. Y. (1980). High-affinity uptake of [3H]taurine in isolated cat retinas: effects of Na⁺ and K⁺. Exp. Eye Res. 31, 373.

Shank, R. P. and Campbell, G. LeM. (1983). Glutamate. In Lajtha, A. editor. Handbook of Neurochemistry, vol. 3, Metabolism in the Nervous System. Plenum Press., New York and London.

Shaw, D. R. and Griffin, M. Jr. (1981). Phagocytosis requires repeated triggering of macrophage phagocytic receptors during particle ingestion. Nature 2 (5796), 409-411.

Starr, M. S. (1978) Uptake of taurine by retina in different species. Brain Res. 151, 604.

Starr, M. S. and Voaden, J. J. (1972). The uptake, metabolism, and release of 14C-taurine by rat retina in vitro. Vision Res. 12, 1261.

Stroeva, O. G. and Mitashov, V. T. (1983). Retinal pigment epithelium: proliferation and differentiation during development and regeneration. International Review of Cytol. 83, 221-293.

Thomas, T. N., and Redburn, D. A. (1978). Uptake of [14C]aspartic acid and [14C]glutamic acid by retinal synaptosomal fractions. J. Neurochem. 31, 63-68.

Wiederholt, M. and Zadunaisky, J. A. (1984). Decrease of intracellular chloride activity by furosemide in frog retinal pigment epithelium. Exp. Eye Res. 3(4), 673-675.

White, R. D. and Neal, M. J. (1976). The uptake of L-glutamate by the retina. Brain Res. 111, 79-93.

Young, R. W. and Bok, D. (1979). Metabolism of the retinal pigment epithelium. In Zinn, K. M. and Marmor, M. F. editors. The retinal pigment epithelium Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Zinn, K. M. and Benjamin-Henkind, J. V. (1979). Anatomy of the human retinal pigment epithelium. In Zinn, K. M. and Marmor, M. F. editors. The retinal pigment epithelium. Harvard University

Press, Cambridge, Massachusetts.